

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenbiologie

Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche in menschlichen Zellen mit  
gezielt genetisch ausgeschalteten DNA-Reparatur-Proteinen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Radi Wieloch  
aus Breslau  
2011

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting  
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. phil. nat. G. Iliakis  
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 23. August 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. Non-homologous end-joining . . . . .	7
1.1.1. Erkennen und Zueinanderfinden . . . . .	7
1.1.2. Modifikation der DNA-Enden . . . . .	9
1.1.3. Ligation . . . . .	11
1.2. Backup non-homologous end-joining . . . . .	12
1.3. Homologe Rekombination . . . . .	14
1.3.1. Konstruktion präsynaptischer Filamente . . . . .	15
1.3.2. Invasion und Synthese . . . . .	17
1.3.3. Trennung . . . . .	18
1.4. Relevanz für den Organismus . . . . .	20
1.5. Relevanz für Krebstherapien . . . . .	21
1.6. Ziel dieser Studie . . . . .	22
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1. Material . . . . .	24
2.1.1. Apparate . . . . .	24
2.1.2. Verbrauchsmaterialien . . . . .	25
2.1.3. Verwendete Chemikalien . . . . .	25
2.1.4. Puffer und Lösungen . . . . .	27
2.2. Methoden . . . . .	29

## *Inhaltsverzeichnis*

2.2.1. Zellkulturen . . . . .	29
2.2.2. Durchflusszytometrie . . . . .	30
2.2.3. Wachstumskurven . . . . .	30
2.2.4. Bestrahlung . . . . .	30
2.2.5. DNA-Reparaturexperiment . . . . .	31
2.2.6. Pulsfeldgelelektrophorese . . . . .	33
2.2.7. Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse der DNA-Reparaturexperimente . . . . .	33
2.2.8. Apoptosequantifizierung . . . . .	36
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1. Wachstumskurven mit verschiedenen Seren . . . . .	39
3.2. Wachstumskurvenvergleich verschiedener NALM Mutanten . . . . .	42
3.3. Wachstumskurven mit verschiedenen initialen Zellkonzentrationen . . . . .	44
3.4. Messung der Reparaturkinetik bei NALM Zellen . . . . .	45
3.4.1. Messung der Reparaturkinetik von NALM Zellen nach der exponentiellen Wachstumsphase . . . . .	46
3.5. Apoptosequantifizierung . . . . .	49
3.6. Reparaturkinetik des NALM Wildtyps . . . . .	53
3.7. Reparaturkinetik DNA Ligase IV und Artemis-defizienter NALM Zellen . . . . .	55
3.8. Reparaturkinetik RAD54-defizienter NALM Zellen . . . . .	56
3.9. Reparaturkinetik gleichzeitig DNA Ligase IV und RAD54-defizienter NALM Zellen . . . . .	58
3.10. Reparaturkinetik p53-defizienter NALM Zellen . . . . .	59
<b>4. Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1. Hintergrund . . . . .	61
4.2. Entwicklung eines Testsystems zur Messung der Reparaturkinetik von NALM Zellen . . . . .	65



## *Inhaltsverzeichnis*

4.2.1. Wachstumsverhalten von NALM Zellen . . . . .	65
4.2.2. Frühes Aufkommen apoptotischer Zellen in NALM Zellkulturen	66
4.2.3. Empfindlichkeit von NALM Zellen gegenüber Röntgenstrahlung oder Applikation von Wortmannin . . . . .	68
4.3. DNA Ligase IV Defizienz und DNA-PK-Inhibition . . . . .	70
4.4. Artemis-Defizienz . . . . .	72
4.5. RAD54-Defizienz . . . . .	74
4.6. p53-Defizienz . . . . .	76
4.7. B-NHEJ . . . . .	78
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>A. Verwendete Abkürzungen</b>	<b>95</b>
<b>B. Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>C. Lebenslauf</b>	<b>98</b>

# 1. Einleitung

Das Genom einer Zelle ist ständig Einflüssen ausgesetzt, die Noxen in diesem hervorgerufen können. Dazu gehören äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung und Chemikalien, z.B. Kohlenwasserstoffe wie Topoisomeraseinhibitoren. Aber auch durch körpereigene Prozesse wie Rekombination der Desoxyribonukleinsäure (DNA), Fehler in der DNA-Replikation und durch im Zellmetabolismus entstehende reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) treten Schäden auf. Diese Schäden können sowohl die Basen als auch das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrad betreffen. Bricht dieses Rückgrad, entsteht ein DNA-Einzelstrangbruch. Sind zwei Einzelstrangbrüche an gegenüberliegenden DNA-Strängen bis zu ca. 20 Basenpaare voneinander entfernt, entsteht ein DNA-Doppelstrangbruch (DNA double strand break, DSB). DSBs sind für eine Zelle äußerst gefährlich. Unrepariert können sie zum Tod der Zelle führen. Eine falsche Reparatur kann Informationsverlust, Mutationen, Genominstabilität und die Entstehung von Krebs zur Folge haben. In menschlichen Zellen, wie auch in Zellen anderer Säugetiere, sind drei DSB-Reparaturmechanismen bekannt: Das non-homologous end-joining (NHEJ), das backup non-homologous end-joining (B-NHEJ) und die homologe Rekombination (HR).

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Beitrag einzelner DSB-Reparaturmechanismen und einiger ihrer Komponenten an der Gesamtreparatur der DSBs in menschlichen Zellen. Dazu wurden Zellen untersucht, bei denen diese Komponenten gezielt genetisch ausgeschaltet oder chemisch inhibiert wurden. Bevor wir uns der genauen Vorgehensweise (Kapitel 2) und den Ergebnissen (Kapitel 3) zuwenden, werden in diesem

## 1. Einleitung

Kapitel zunächst die drei genannten Reparaturmechanismen vorgestellt, die Bedeutung der DNA-Reparatur für den Organismus sowie für die Krebstherapie besprochen und der Ansatzpunkt dieser Studie dargestellt. Der genaue Hintergrund und die einzelnen Ziele dieser Studie werden am Anfang des Kapitels 4 erläutert. Abschließend werden die Ergebnisse diskutiert.

### 1.1. Non-homologous end-joining

Das NHEJ stellt in menschlichen Zellen den Hauptreparaturmechanismus für DSBs dar [Valerie, Povirk, 2003, Mao et al., 2008]. Die an diesem Mechanismus beteiligten Proteine sind im Wesentlichen KU, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs), Artemis, DNA Ligase IV, Röntgenstrahlen-komplementierendes Gen 4 des chinesischen Zwerghamsters (X-ray-complementing Chinese hamster gene 4, XRCC4) und XRCC4-ähnlicher Faktor (XRCC4-like factor, XLF, auch Cernunnos genannt). Die Reparatur erfordert, dass der Bruch zunächst erkannt wird, die Enden des betroffenen DNA-Stranges zueinander finden, die Enden so gestaltet werden, dass sie religiert werden können, und die Ligation selbst. Auf Abbildung 1.1., Seite 8, ist das NHEJ schematisch dargestellt.

#### 1.1.1. Erkennen und Zueinanderfinden

Das derzeitige Modell besagt, dass die freien Enden des von einem DSB betroffenen DNA-Stranges zunächst von KU gebunden werden. Vom Auftreten des DSBs bis zum Binden von KU vergehen nur wenige Sekunden [Kim et al., 2005]. KU bindet mit hoher Affinität an DNA-Enden und besteht aus den beiden Untereinheiten KU70 und KU80, welche sehr ähnlich aufgebaut sind [Walker et al., 2001]. Beide Untereinheiten bestehen jeweils aus einem umfangreichen Fundament, das sich an die DNA-Enden anlagert, und einer sehr schmalen Brücke, die eine Schlinge um die DNA bildet. Diese Schlinge verhindert Bindungen hoher Affinität an *intakte* DNA-Stränge. Enden von

## 1. Einleitung

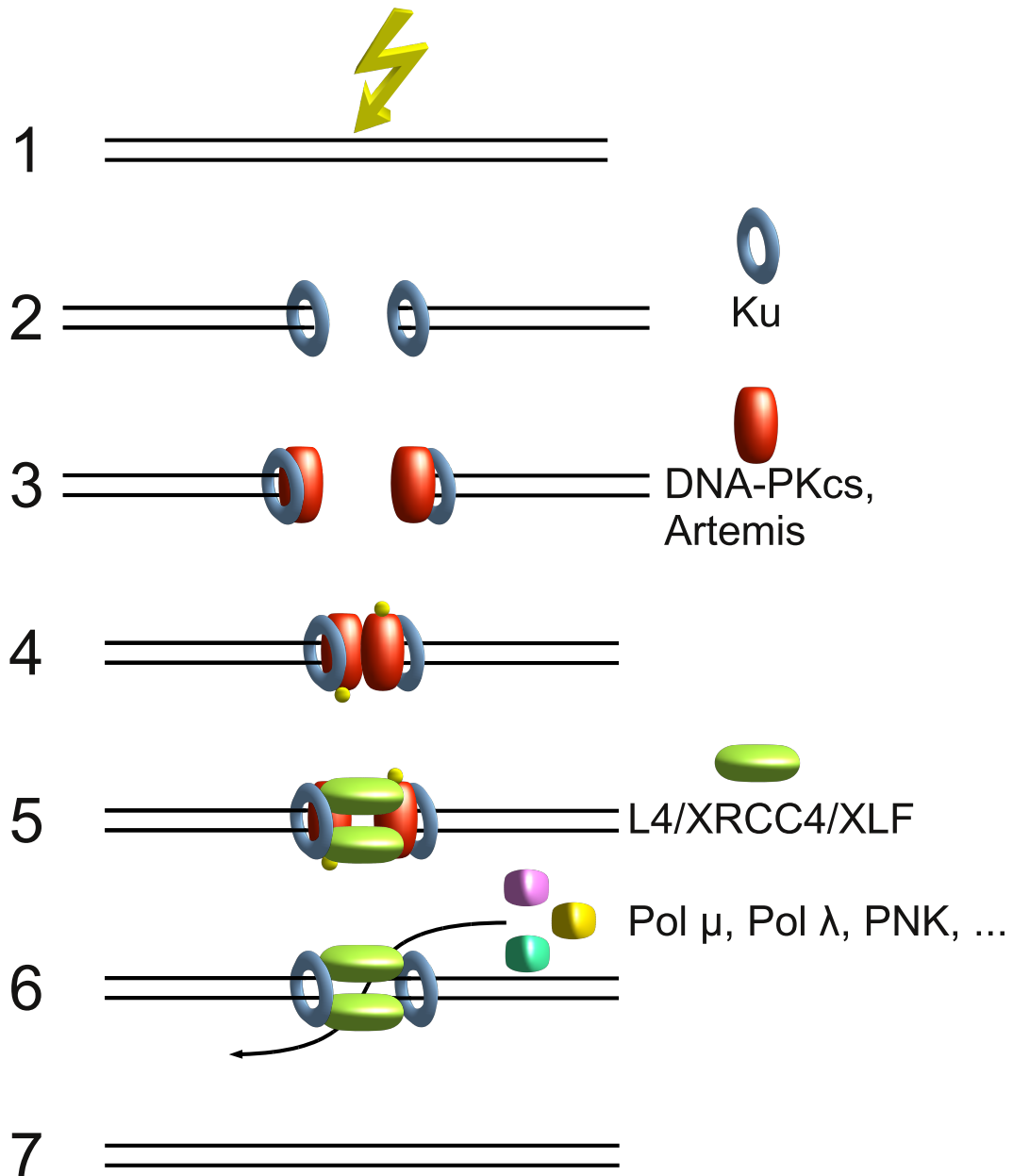


Abbildung 1.1.: **Mögliches Modell des NHEJs.** Ionisierende Strahlung kann DNA schädigen (1). Die Enden des entstandenen DSBs werden durch KU gebunden (2). Dieses bewegt sich von den Enden weg und rekrutiert DNA-PKcs, möglicherweise zusammen mit Artemis. Es entsteht DNA-PK (3). Die beiden DNA-PK lagern sich einander an und phosphorylieren daraufhin sich und andere Proteine (4). Durch die Phosphorylierung (gelbe Punkte) verursachte Konformationsänderungen machen die Enden anderen Proteinen zugänglich. Artemis modifiziert die Enden, falls nötig. Der DNA Ligase IV/XRCC4/XLF Komplex wird rekrutiert (5). Wann genau sich DNA-PK löst, ist nicht bekannt. Die Enden werden ggf. durch verschiedene Proteine modifiziert und dann durch DNA Ligase IV aneinandergebunden (6). Die DNA ist wieder intakt und wird freigegeben (7).

## 1. Einleitung

DNA-Strängen, wie sie bei DSBs vorkommen, können jedoch in diese hineingleiten. Beide Untereinheiten zusammen bilden eine ringförmige Struktur, die den DNA-Strang fest umfasst.

KU rekrutiert daraufhin DNA-PKcs [Uematsu et al., 2007], welches an das äußerste Ende des Stranges bindet, während sich KU ca. eine Helixwindung weit vom Ende weg bewegt [Yoo, Dynan, 1999]. Die Struktur von DNA-PKcs hat eine Kopfreion mit zwei Armen, welche zusammen einen offenen Ring bilden. Betrachtet man den Ring seitlich, so erinnert er an eine Wiege. Es wird vermutet, dass die Arme ähnlich einer Ummarmung bewegt werden können, so dass die Öffnung des Ringes erweitert wird, was es DNA-PKcs ermöglichen würde, sich hierdurch von einem reparierten DNA-Strang zu lösen [Sibanda et al., 2010]. Die Kombination aus KU70, KU80 und DNA-PKcs wird DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) genannt. Die DNA-PK der beiden Enden können sich aneinanderlagern und eine Art Brücke bilden, die die DNA-Enden aneinanderhält [DeFazio et al., 2002]. Dadurch werden die DNA-PKcs aktiviert und phosphorylieren mehrere Proteine, einschließlich KU und sich selbst. Die hierdurch verursachte Konformationsänderung ermöglicht es anderen Proteinen, sich direkt an die DNA-Enden anzulagern, welche bis dahin vor Nukleasen geschützt sind [Hammel et al., 2010].

### 1.1.2. Modifikation der DNA-Enden

Die Schäden am DNA-Strang, die bei einem DSB auftreten, können sehr verschieden sein. Es können Veränderungen an den Basen und am Phosphat-Desoxyribose-Rückgrad entstehen und die beiden DNA-Stränge eines Endes variieren in ihrer Länge, so dass ein 3'- oder 5'-Überhang vorliegen kann, oder aber beide Stränge gleich lang sind [Ward, 1988]. Desweiteren katalysieren alle DNA Ligasen, also auch die beim NHEJ beteiligte DNA Ligase IV, das Ausbilden einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat und einer 3'-Hydroxygruppe [Ellenberger, Tomkinson, 2008], so dass diese Konstellation an den Enden vorausgesetzt wird. Die Enden nach dem Auftre-

## 1. Einleitung

ten eines DSBs können oftmals nicht unmittelbar miteinander verbunden werden. In solchen Fällen ist es notwendig, diese vorher umzugestalten. Das Umgestalten kann von mehreren Proteinen vorgenommen werden. Dazu gehören Artemis, PNK, PALF, die DNA Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  und die nur in Lymphozyten exprimierte terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT).

Artemis hat eine Endonukleasefunktion und eine 5' zu 3' Exonukleasefunktion. In Verbindung mit DNA-PKcs entwickelt es eine versatilere Endonukleasefunktion, die an Überhängen und strukturellen Veränderungen der DNA wie Schleifen (loops), Blasen (bubbles), Umschlägen (flaps) und Lücken (gaps) tätig werden kann. Außerdem hat Artemis auch die Fähigkeit, Haarnadelstrukturen zu öffnen, wie sie in der V(D)J-Rekombination vorkommen, und 3'-Glykolatrete zu entfernen [Ma et al., 2002, Ma et al., 2005, Povirk et al., 2007]. DNA-PK induziert bei Artemis eine Verschiebung von der exonukleolytischen zur endonukleolytischen 5'-Resektion hin und begrenzt das Ausmaß des Abschneidens der DNA-Enden [Yannone et al., 2008].

5'-Hydroxygruppen können durch die Polynukleotidkinase (PNK) in 5'-Phosphatreste konvertiert werden [Chappell et al., 2002], welche neben einer Kinase- auch eine Phosphatase-Domäne hat [Bernstein et al., 2005]. PALF (PNK and APTX-like FHA protein, auch APLF, aprataxin- and PNK-like factor, genannt) ist eine Endonuklease und eine 3' zu 5' Exonuklease und ist wahrscheinlich im Rahmen des NHEJs tätig [Kanno et al., 2007]. Da die Richtung der Exonukleasefunktion umgekehrt zu der von Artemis ist, würde PALF eine interessante Ergänzung zu diesem sein. KU hat eine 5'-Desoxyribose-5-Phosphat Lyase Funktion, wodurch Desoxyribose, die ihre Base verloren hat, an ihrem 3'-Ende herausgeschnitten werden kann [Roberts et al., 2010].

Die DNA Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  können Lücken und Enden mit Nukleotiden auffüllen. Der Unterschied zwischen ihnen ist, dass Polymerase  $\lambda$  eine Vorlage benötigt, die zudem mit dem zu verlängernden Strang gepaart sein muss, während Polymerase  $\mu$  auch einen ungepaarten Strang als Vorlage nutzen und darüber hinaus vorlagenunabhängig arbeiten kann, also auch dann die Möglichkeit hat, Nukleotide einem DNA-Strang hin-

## 1. Einleitung

zuzufügen, wenn diesem kein zweiter DNA-Strang gegenüberliegt. TdT dagegen kann Nukleotide nur vorlagenunabhängig anfügen. Im Rahmen der V(D)J Rekombination, in der TdT partizipiert, führt das zu einer erwünschten, großen Diversität an Antikörpern und T-Zell Rezeptoren [Nick McElhinny et al., 2005].

Da das Umgestalten unabhängig von Vorlagen ablaufen kann, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das Resultat nicht dem Zustand vor dem DSB entspricht – es kann mehr oder weniger oder andere Nukleotide enthalten. Das NHEJ ist also ein fehlerbehafteter Reparaturmechanismus. Diese Fehler können Mutationen zur Folge haben.

### 1.1.3. Ligation

Die Ligation der Enden wird durch DNA Ligase IV durchgeführt. Sie bildet einen festen Komplex mit einem XRCC4 Dimer und einem XLF Dimer [Li et al., 2008]. XRCC4 besteht aus einer Kopfdomäne und einem langen Alphahelix-Schwanz. In der Form eines Homodimers sind die Schwänze von zwei XRCC4 umeinandergewunden und bilden eine coiled coil [Sibanda et al., 2001]. XRCC4 stabilisiert DNA Ligase IV [Bryans et al., 1999] und erhöht ihre Aktivität [Grawunder et al., 1997]. XLF ist strukturell relativ ähnlich zu XRCC4. So besteht es auch aus einer Kopfregion und einem – in diesem Fall kürzeren – Alphahelix-Schwanz und zwei XLF bilden zusammen ein Homodimer mit einer coiled coil ihrer Schwänze [Li et al., 2008]. XLF stimuliert die Ligation durch DNA Ligase IV, insbesondere bei nichtkomplementären Enden [Gu et al., 2007a] und ist essenziell für das Auffüllen von Lücken durch die DNA Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  [Akopiants et al., 2009]. Der XRCC4/DNA Ligase IV Komplex ist sehr flexibel, da er DNA-Enden auch dann miteinander verbinden kann, wenn die Basenpaare dieser nicht zueinander komplementär sind. Selbst über Lücken von einem Nukleotid hinweg kann er ligieren, dann allerdings sollten die Enden 1–4 Basenpaare ausgebildet haben. Desweiteren kann er zuerst nur einen Strang ligieren, während der andere zunächst unligiert bleibt, möglicherweise, damit letzterer weiterhin umgestaltet werden kann [Gu et al., 2007b].

## 1.2. Backup non-homologous end-joining

Das Backup non-homologous end-joining (B-NHEJ, auch alternative non-homologous end-joining) wird deswegen so genannt, weil dieses im Normalfall, wenn das NHEJ funktioniert, wenig zum Tragen kommt. Funktionieren wichtige Bestandteile des NHEJs wie KU, DNA-PKcs, XRCC4 und DNA Ligase IV nicht, oder fehlen diese, dann kommt das B-NHEJ mehr zum Tragen. In diesem Kontext wird das NHEJ auch DNA-PK dependent end-joining (D-NHEJ) genannt [Perrault et al., 2004]. Im Vergleich zum NHEJ ist das B-NHEJ wesentlich langsamer und beseitigt DSBs vergleichsweise fehlerhaft [Iliakis et al., 2004, Bennardo et al., 2008]. Es ist wahrscheinlich ein eigener Reparaturmechanismus, in den andere Proteine involviert sind, als beim NHEJ – zu diesen werden Histon H1, PARP-1 und DNA Ligase III mit ihrem Kofaktor XRCC1 gezählt [Audebert et al., 2004, Wang et al., 2005, Wang et al., 2006, Rosidi et al., 2008]. Abbildung 1.2., Seite 13, zeigt eine schematische Darstellung.

Die Enzymologie und die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht hinreichend geklärt. Ein mögliches Modell besagt, dass im Normalfall KU mit seiner höheren Affinität an die DNA-Enden bindet und dadurch die Reparatur des DSBs durch das NHEJ einleitet, da PARP-1 und Histon H1 nicht mehr binden können oder verdrängt werden [Wang et al., 2006]. KU rekrutiert dann DNA-PKcs und die zum NHEJ gehörenden Proteine reparieren den DSB. Umgekehrt, sollten KU oder andere wichtige Proteine des NHEJs fehlen oder nicht funktionieren, würden PARP-1 und Histon H1 das B-NHEJ einleiten. Histon H1 fördert die Ligase-Aktivität von DNA Ligase III und DNA Ligase IV, wobei der Effekt auf DNA Ligase III wesentlich stärker ist. Die Aktivität von PARP-1 wird ebenfalls erhöht. Möglicherweise richtet Histon H1 die DNA-Enden zueinander aus, bevor diese durch einen PARP-1/DNA Ligase III/XRCC1 Komplex ligiert werden können [Rosidi et al., 2008]. Es kann außerdem auch sein, dass Histon H1 das NHEJ behindert, indem KU daran gehindert wird, sich von den Enden weg zu bewegen, was wichtig für das Rekrutieren weiterer Faktoren des NHEJs ist. Eine Phosphorylierung von Histon H1 durch DNA-PK wiederum verringert dessen Affinität



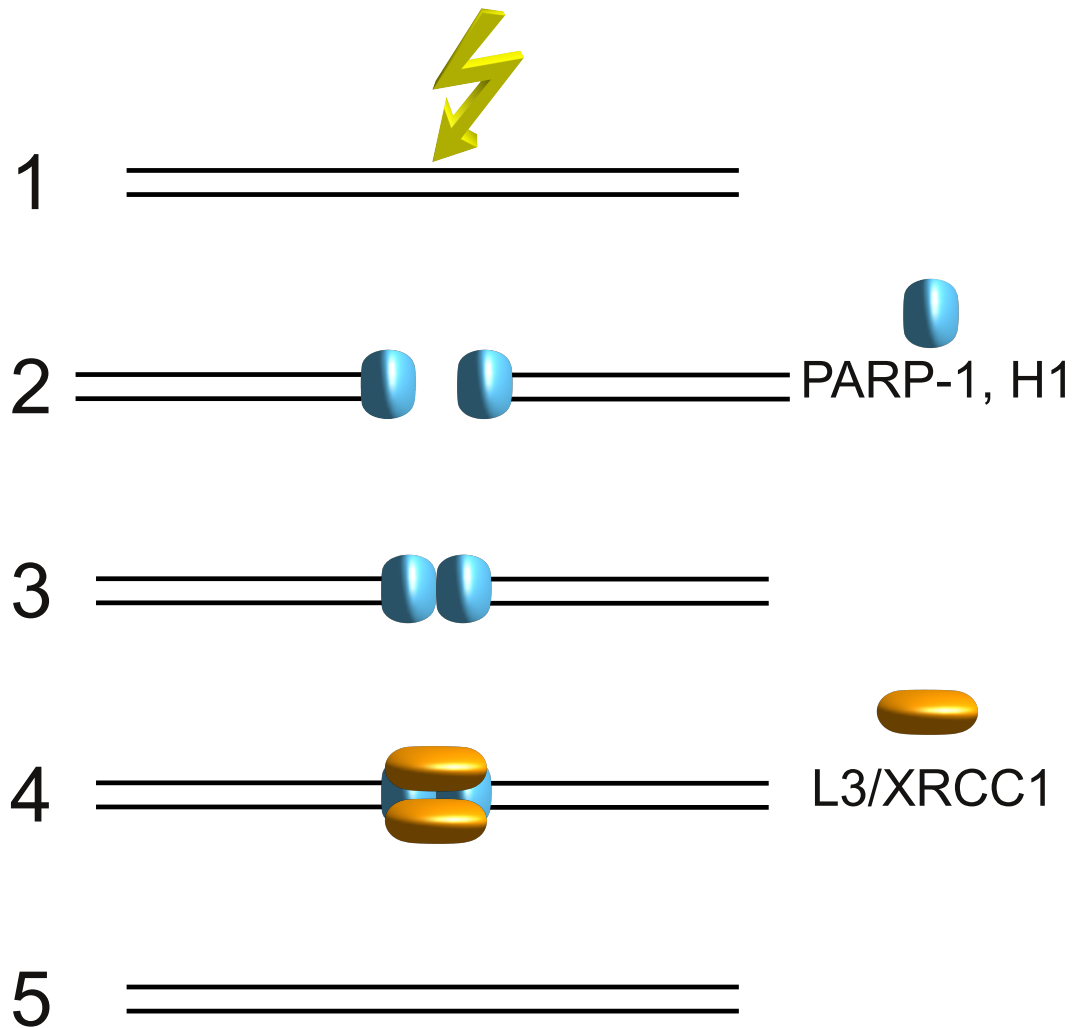


Abbildung 1.2.: **Mögliches Modell des B-NHEJs.** DNA kann durch ionisierende Strahlung geschädigt werden (1). Die Enden des entstandenen DSBs werden durch PARP-1 und Histon H1 (H1) gebunden (2). Die Enden finden zueinander (3). DNA Ligase III (L3) und XRCC1 werden rekrutiert (4). Der DNA Ligase III/XRCC1/PARP-1 Komplex ligiert die Enden und die wieder intakte DNA wird freigegeben (5).

## 1. Einleitung

zu DNA, weshalb diese Phosphorylierung ein Entfernen von Histon H1 zum Ziel haben könnte, um das NHEJ zu fördern [Kysela et al., 2005].

MRE11 (Meiotische Rekombination 11, meiotic recombination 11) scheint ebenfalls am B-NHEJ beteiligt zu sein. Eine Inhibition von MRE11 verringert die Effizienz des B-NHEJs, während eine Überexpression von MRE11 die Effizienz des B-NHEJs erhöht. Es wird angenommen, dass die Nukleaseaktivität von MRE11, welche DNA-Enden reseziert, sowohl die homologe Rekombination als auch das B-NHEJ fördert, abhängig vom Vorhandensein homologer Sequenzen, von Proteinregulation und des Ausmaßes der Resektion, wobei es die kurzen Resektionen sind, die das B-NHEJ fördern [Rass et al., 2009]. Mögliche Homologien der durch die Resektion entstandenen Überhänge zueinander könnten diese aneinander binden lassen. Das B-NHEJ funktioniert aber auch ohne diese Mikrohomologien [Mansour et al., 2010].

Die Reparatur durch das B-NHEJ hat häufig kleine Deletionen, kleine Strecken an Homologie an den Bruchpunkten und Translokationen zur Folge [Yan et al., 2007, Mansour et al., 2010]. Sie hilft der Zelle dabei, ihr Genom instand zu halten und ihr Überleben zu ermöglichen. Die Fehler, die durch das B-NHEJ auftreten, verursachen aber genomische Instabilität und können eine maligne Entartung auslösen. Die ungünstige Konsequenz könnte auf der insuffizienten Synapse der DNA-Enden basieren, welche möglicherweise nur durch Histon H1 und Mikrohomologie unterstützt wird, weshalb sie im Vergleich zur Synapse durch DNA-PK langsam und ineffizient ist. Die daraus resultierende Persistenz der Enden könnte dazu führen, dass nicht die ursprünglich zueinander gehörenden Enden miteinander verbunden werden, oder in der Zwischenzeit die Enden degradiert werden, wodurch Information verloren geht [Iliakis et al., 2004].

### 1.3. Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination ist ein Mechanismus, der für mehrere biologische Prozesse wichtig ist. Durch die Reparatur von DSBs, inkompletter Telomere, Querverbindungen

## 1. Einleitung

von DNA-Strängen und beschädigter Replikationsgabeln hält HR die Stabilität des Genoms aufrecht. Auch in der Meiose spielt sie eine tragende Rolle. Sie führt einerseits zum Informationsaustausch zwischen den mütterlichen und den väterlichen Allelen und trägt dadurch zu einer Vielfalt an möglichen Nachkommen bei. Andererseits ist sie auch zur richtigen Trennung von homologen Chromosomenpaaren notwendig, damit Gameten mit der korrekten Chromosomenanzahl entstehen. Die meiotische HR wird durch DSBs initiiert, welche durch SPO11 induziert werden [Neale, Keeney, 2006]. Die Reparatur von DSBs durch HR beruht darauf, identische oder ähnliche Sequenzen auf einem zweiten DNA-Molekül zu finden, die dann als Vorlage für das Wiederherstellen der Sequenz der geschädigten DNA dienen. Durch das Benutzen des homologen Chromosoms oder des Schwesterchromatids als Vorlage, kann das beschädigte Molekül potentiell fehlerfrei wiederhergestellt werden.

Die HR ist durch mehrere aufeinanderfolgende Schritte charakterisiert:

- Resektion der DNA-Stränge mit den 5'-Enden
- Konstruktion eines präsynaptischen Filamentes am Strang mit dem 3'OH-Ende
- Invasion einer homologen DNA-Sequenz durch das präsynaptische Filament
- Verlängerung des 3'OH-Endes mit der homologen Sequenz als Vorlage
- Und zuletzt die Auflösung der Rekombinationsprodukte.

Auf Abbildung 1.3., Seite 16, wird die HR schematisch veranschaulicht. Im Folgenden werden die wesentlichen Mechanismen dieser Schritte erläutert, wie sie laut gegenwärtiger Vorstellung in menschlichen Zellen vorkommen.

### 1.3.1. Konstruktion präsynaptischer Filamente

DSBs werden zunächst durch den MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) Komplex erkannt und gebunden. Daraufhin werden die 5'-Enden in 5' zu 3' Richtung reseziert, wodurch 3'-Überhänge entstehen. Für diese Resektion werden MRN und CtIP (C-Terminus bin-

## 1. Einleitung

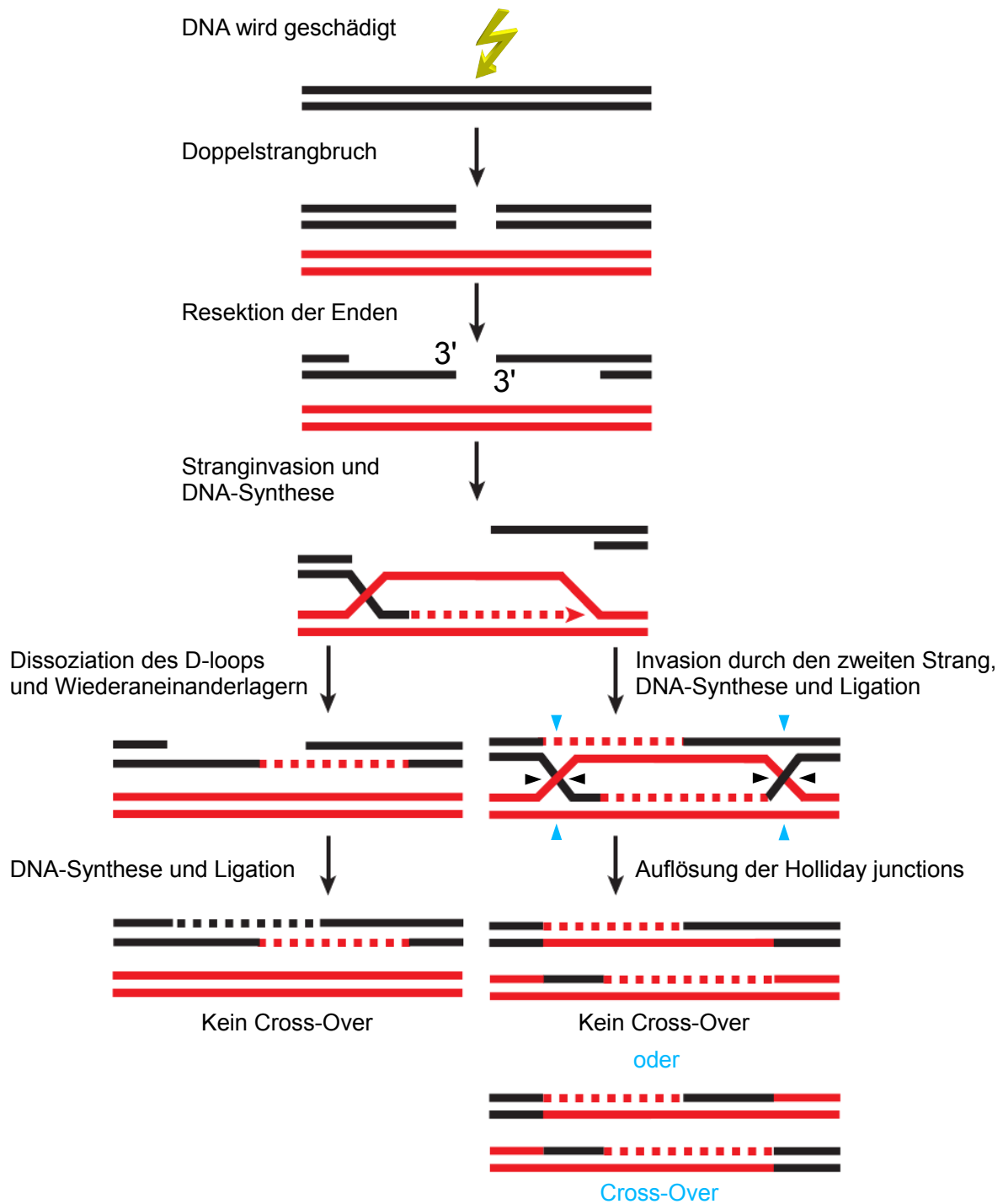


Abbildung 1.3.: **Mögliches Modell der HR.** Die schwarzen und blauen Dreiecke zeigen an, an welchen Stellen geschnitten wird, um eine Auflösung der Holliday junctions ohne bzw. mit Cross-Over zu realisieren. Modifiziert nach [San Filippo et al., 2008].

## 1. Einleitung

ndendes Protein interagierendes Protein, C-terminal binding protein interacting protein) benötigt, aber ob die Resektion durch eine funktionelle Einheit aus MRN und CtIP als Nuklease fungiert, oder ob sie als Katalysator für andere unidentifizierte Enzyme dient, ist unklar [Limbo et al., 2007, Takeda et al., 2007]. RAD51 ist ein Protein, das eine Helix um Einzelstrang-DNA bildet [Yu et al., 2001]. Das dadurch entstehende Filament wird als präsynaptisches Filament bezeichnet.

Die 3'-Überhänge werden aber zuerst durch das replication protein A (RPA) gebunden, welches ein sehr reichhaltig vorhandenes DNA-Einzelstrang-bindendes Protein ist und mit hoher Affinität an Einzelstrang-DNA bindet [Wold, 1997]. Um ein präsynaptisches Filament aufzubauen, muss diese hohe Affinität überwunden werden. Dieses geschieht mit Hilfe des breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2), welches mehrere Funktionen hat. Es verstärkt das Binden von RAD51 an Einzelstrang-DNA, beschleunigt das Ersetzen von RPA durch RAD51, inhibiert die ATPase-Aktivität von RAD51 und begrenzt sein Binden an Doppelstrang-DNA [Jensen et al., 2010]. Die Inhibition der ATPase-Aktivität von RAD51 ist wichtig, weil das präsynaptische Filament durch ATP stabilisiert wird und die ATPase-Aktivität von RAD51 die Bindung von diesem an Einzelstrang-DNA abschwächt [Chi et al., 2006]. An Doppelstrang-DNA gebundenes RAD51 wiederum behindert ihre Paarung mit Einzelstrang-DNA [Sung, Robberson, 1995], was bei der HR aber angestrebt wird.

### 1.3.2. Invasion und Synthese

Das präsynaptische Filament bindet an Doppelstrang-DNA [Sung, Robberson, 1995], auch als Invasion bezeichnet, wodurch der sogenannte synaptische Komplex entsteht, und sucht in der Doppelstrang-DNA nach einer homologen Sequenz zu seinem DNA-Einzelstrang. Wird diese gefunden, entsteht eine Struktur namens displacement loop (D-loop): Der DNA-Strang des präsynaptischen Filamentes und der zu ihm homologe Strang des gebundenen DNA-Moleküls bilden Basenpaare aus. Der zuvor mit dem homologen Strang verbundene Strang wird dafür verdrängt. An das 3'-Ende wird da-

## 1. Einleitung

raufhin DNA angebaut, wobei die homologe Sequenz als Vorlage benutzt wird. Da bei einem DSB zwei präsynaptische Filamente vorliegen, können sich beide an die homologen Sequenzen des intakten DNA-Moleküls anlagern, so dass in einem solchen Falle zwei Holliday junctions, mobile Verzweigungen aus vier DNA-Strängen, entstehen. RAD54 kann ATP-abhängig die Migration der Verzweigungen sowohl in 3' zu 5' als auch 5' zu 3' Richtung fördern [Bugreev et al., 2006]. Welche Polymerase die Synthese *in vivo* durchführt, ist derzeit unklar. *In vitro* kann diese Aufgabe durch die DNA Polymerase  $\eta$  durchgeführt werden [McIlwraith et al., 2005].

### 1.3.3. Trennung

Nach der Synthese ist es notwendig, die DNA-Moleküle wieder voneinander zu trennen. Ist nur ein D-loop entstanden, so kann sich der DNA-Strang, der zum präsynaptischen Komplex gehörte, lösen und an das zweite nichtresezierte Ende des DNA-Moleküls mit dem DSB anlagern. Letzteres kann dann verlängert werden, indem der neu synthetisierte Strang seinerseits als Vorlage benutzt wird, was die noch fehlende resezierte Sequenz wiederherstellt. Anschließend muss ligiert werden. Liegen zwei Holliday junctions vor, entsteht entweder ein Cross-Over oder nicht, je nachdem, wie die beiden Holliday junctions getrennt werden. Bei einem Crossing-Over werden Segmente der interagierenden Chromosomen vertauscht [San Filippo et al., 2008].

Das Auflösen der Holliday junctions kann wahrscheinlich durch mehrere verschiedene Enzymkomplexe durchgeführt werden. Ein Komplex aus Bloom syndrome protein (BLM), Topoisomerase III $\alpha$  und BLM-associated polypeptide (BLAP75) kann Holliday junctions so auflösen, dass daraus kein Cross-Over resultiert, indem BLM die Holliday junctions aufeinander zulaufen lässt, bis sie sich treffen, und Topoisomerase III $\alpha$  diese dann so schneidet, dass die ursprünglichen Stränge wieder zueinander finden [Wu, Hickson, 2003, Raynard et al., 2006]. Der MUS81-EME1 Endonukleasekomplex kann Holliday junctions mit resultierendem Cross-Over trennen [Constantinou et al., 2002]. GEN1 kann sowohl Cross-Over als auch nicht

## 1. Einleitung

Cross-Over Produkte erstellen [Ip et al., 2008]. RAD54 kann D-loops dissoziieren [Bugreev et al., 2007]. Darüber hinaus scheint RAD54 sehr vielseitig an der homologen Rekombination beteiligt zu sein. Dazu gehört das bereits erwähnte ATP-abhängige Fördern der Migration von Holliday junctions, das Laden von RAD51 auf Einzelstrang-DNA, Stimulation der Homologiesuche und Assoziation homologer Sequenzen sowie die Stimulation der Zerteilung von DNA durch MUS82-EME1 [Mazin et al., 2010].

Die HR kann DSBs potentiell fehlerfrei reparieren. Dazu muss das Schwesterchromatid als Vorlage benutzt werden. Wird jedoch das homologe Chromosom als Vorlage benutzt, so kann die ursprünglich auf dem geschädigten Chromosom enthaltene Information verloren gehen, da die Sequenz auf dem homologen Chromosom zwar ähnlich, aber doch etwas anders sein kann. Da dann auf beiden Chromosomen die gleiche Sequenz enthalten ist, ist die Heterozygotie verloren gegangen. Geschieht dies bei Genen, die für Zellwachstum und Differenzierung regulierende Proteine kodieren, kann das zu einer malignen Entartung der Zelle führen. Gibt es auf dem Schwesterchromatid, dem homologen Chromosom, einem nichthomologen Chromosom oder dem geschädigten Chromosom selbst eine Sequenz, die ähnlich ist, kann es passieren, dass diese als falsche Vorlage benutzt wird, obwohl sie für etwas anderes kodiert. Auch hier geht die ursprüngliche Information verloren.

Desweiteren kann ein Crossing-Over entweder konsequenzlos mit einem Schwesterchromatid passieren, oder aber mit dem homologen Chromosom. In letzterem Fall führt das zu einer neuen Kombination der Allele. Das ist bei einer Meiose zwar für die Vielfalt der möglichen Nachkommen wichtig, führt aber bei einer somatischen Zelle zu einer Informationsänderung, die sich nachteilig auswirken kann. Möglicherweise funktioniert das aus der neuen Sequenz resultierende Protein nicht mehr richtig.

## 1.4. Relevanz für den Organismus

Die Reparatur von DSBs spielt eine fundamental wichtige Rolle im Altern, im Immunsystem, in der Entstehung von Krebs und dem Überleben allgemein. Wie wichtig es ist, dass die Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur richtig funktionieren, wird deutlich, wenn diese gestört sind. Dabei kann es ausreichen, dass auch nur ein einziges Protein defekt ist, um sehr gravierende Auswirkungen auf den Gesamtorganismus zu haben.

Beim seltenen Ligase IV Syndrom, einer autosomal rezessiven Erkrankung, beispielsweise, liegen Mutationen im für DNA Ligase IV kodierenden Gen LIG4 vor, die die Expression oder die Leistungsfähigkeit der am NHEJ beteiligten DNA Ligase IV verringern. Die Patienten leiden an ausgeprägter Radiosensitivität, genomischer Instabilität, malignen Entartungen, Immundefizienz und Knochenmarkdepression. Klinisch zeigen sich eine Mikrozephalie, veränderte Morphologie des Gesichtes, Wachstumsretardierung, Entwicklungsstörungen und Panzytopenie. Mäuse, bei denen LIG4 ausgeschaltet wurde, sterben bereits im Embryonalstadium und Menschen mit zwei amorphen Allelen sind nicht bekannt, weshalb angenommen wird, dass mindestens ein hypomorphes Allel zur Lebensfähigkeit notwendig ist [Chistiakov et al., 2009].

Funktioniert Artemis nicht, löst das beim Menschen die radiosensitive severe combined immunodeficiency (RS-SCID) aus, bei der die Ausreifung der B- und T-Lymphozyten massiv gestört ist. Ohne Knochenmarktransplantation sterben die Patienten innerhalb des ersten Lebensjahres an Infektionen [Moshous et al., 2001].

Beim Bloom Syndrom ist das BLM Protein defekt, welches bei der homologen Rekombination Holliday junctions ohne Cross-Over trennt [Raynard et al., 2006]. Ohne dieses kommt es zehnfach häufiger zum Crossing-Over und daraus folgend zu einer Instabilität des Genoms mit einer starken Prädisposition gegenüber Krebserkrankungen als Konsequenz [Killen et al., 2009]. Desweiteren sind die Patienten wachstumsretardiert, immundefizient, photosensitiv, anämisch, haben verringertes subkutanes Fettgewebe, eine Prädisposition gegenüber Diabetes mellitus Typ II und sterben mit ungefähr



## 1. Einleitung

30 Lebensjahren – üblicherweise an Krebs [Capell et al., 2009].

Generell gibt es bei Syndromen des vorzeitigen Alterns, den Progerien, Hinweise auf gehäuft auftretende DNA-Schäden oder eine defekte Reparatur dieser [Capell et al., 2009].

### 1.5. Relevanz für Krebstherapien

Das Verständnis von DNA-Reparaturmechanismen ermöglicht gezielte Therapieansätze bei Krebsarten, bei denen durch Biomarker bestimmte Defekte in den Reparaturmechanismen gefunden werden, und die Wirksamkeit von Therapien wird vorhersagbarer. Dass DNA-Strangbrüche eine tödliche Wirkung auf Zellen haben können, macht man sich in der Krebstherapie zunutze. So verwendet man in der Radiotherapie ionisierende Strahlung und in der Chemotherapie Topoisomerase II Inhibitoren, um DSBs hervorzurufen. Daneben gibt es Chemotherapeutika wie Alkylantien, Topoisomerase I Inhibitoren und Nukleotid-Antimetabolite, die die DNA schädigen. Zellen, deren Reparaturmechanismen schlecht funktionieren, sind einerseits anfälliger darauf, maligne zu entarten, andererseits reagieren sie teilweise um ein vielfaches sensibler auf solche Therapieansätze [Helleday, 2010].

Ein Beispiel ist der Einsatz von PARP-1 Inhibitoren bei BRCA2-defizienten Tumoren. PARP-1 spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen. Wird PARP-1 inhibiert, so akkumulieren diese und werden bei der Replikation in DSBs konvertiert, welche vorwiegend durch die homologe Rekombination repariert werden. BRCA2 wiederum spielt eine wichtige Rolle in der homologen Rekombination [Jensen et al., 2010] und ist bei einigen Krebszellen defekt. Diese Krebszellen reagieren auf PARP-1 Inhibitoren hochsensibel [Bryant et al., 2005].

Desweiteren gibt es allgemein Krebszellen, die radiosensibel, aber auch Krebszellen, die radioresistent sind. Da man die Wichtigkeit der Reparaturmechanismen in diesem Zusammenhang kennt, wird versucht, Substanzen, die diese Mechanismen hem-

## 1. Einleitung

men, als Radiosensitizer einzusetzen, um eigentlich radioresistente Krebszellen einer Radiotherapie zugänglich zu machen. Auch der Einsatz als Chemosensitizer ist möglich [Bolderson et al., 2009].

### 1.6. Ziel dieser Studie

Aufgrund der Bedeutsamkeit der DSB-Reparatur wird versucht, die ihr zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen. Ein Ziel dabei ist es, zukünftig Menschen helfen zu können, bei denen die DSB-Reparatur Mängel aufweist, indem die Ursachen dieser Mängel behoben werden. Ein weiteres Ziel ist es, mehr Biomarker für die onkologische Diagnostik zu entwickeln und damit einen Therapieerfolg vorhersagbarer zu machen. Des weiteren wird versucht, Angriffspunkte zu finden, mit dem Ziel, die DSB-Reparatur gezielt zu stören, um gezieltere und effektivere Radio- und Chemotherapien zu ermöglichen. Umgekehrt, wäre es vorteilhaft, wenn man die Radioresistenz bei Menschen erhöhen könnte, wenn man weiß, dass sie erhöhter Strahlung ausgesetzt sein werden. Auch vorteilhafte Effekte auf das Altern sind denkbar.

Eine Vorgehensweise, die Mechanismen der DSB-Reparatur zu untersuchen, ist das gezielte Ausschalten oder Stören von Komponenten der DSB-Reparatur mit anschließender Analyse, wie sich dieses auswirkt. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion dieser Komponenten und die Bedeutsamkeit ihrer Funktion ziehen. Viele Erkenntnisse wurden dabei unter Verwendung nichtmenschlicher Zellen gewonnen. Diese Erkenntnisse sollen aber letztendlich zur Entwicklung von Anwendungen beim Menschen genutzt werden. Allerdings ist es nicht sicher, welche der Erkenntnisse, die mit nichtmenschlichen Zellen gewonnen wurden, auch auf den Menschen übertragbar sind. Die vorliegende Studie zielt auf dieses Problem hin. Dabei wird ausgenutzt, dass seit einiger Zeit gezielte Genmodifikation bei menschlichen Zellen effizient durchgeführt werden kann. Es werden eine menschliche Zelllinie und Varianten dieser untersucht, bei denen bestimmte an der DSB-Reparatur beteiligte Proteine gezielt genetisch aus-

## *1. Einleitung*

geschaltet wurden. Durch Röntgenstrahlen werden bei ihnen DSBs hervorgerufen und anschließend die Reparatur dieser gemessen. Durch Vergleich der Ergebnisse untereinander und mit den Ergebnissen anderer Zelllinien wird die Bedeutung der Proteine und der von ihnen abhängigen Mechanismen ersichtlich. Auf diese Weise wird das Wissen über die DSB-Reparatur beim Menschen erweitert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Apparate

CO <sub>2</sub> -Inkubator	MCO-18M, Sanyo, Japan
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter, Deutschland
Elektrischer Pipettenfüller	BD Falcon Express™ Pipet-Aid®, BD Biosciences, USA
Fluoreszenz Scanner	Typhoon 9410, Molecular Dynamics, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	Horizon 20-25, Life Technologies, USA Model H4, Life Technologies, USA
Konfokales Mikroskop	TCS SP5, Leica Microsystems, Deutschland
Magnetrührer	MR Hei-Mix L, Heidolph, Deutschland
Mikroliterpipetten	Pipet-Lite®, Rainin, USA
pH-Meter	inoLab®, WTW, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop, invertiert	IMT-2, Olympus, Japan
Röntgenröhre	Isovolt 320, Seifert-Pantak, USA
Sicherheitswerkbank	MSC 1.8, Thermo Electron LED, Deutschland
Waage	BP 110 S, Sortorius, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Wasserbad	Typ 1083, GFL, Deutschland
Zellzähler	Multisizer™ 3 Coulter Counter, Beckman Coulter, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus, Deutschland

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Gerhard Menzel, Deutschland
Reagenzgläser, 12 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Kühlschrankbehälter	Famos-Westmark, Deutschland
Kunststoffgefäße, 1,5 ml, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Petrischalen, Pipetten und Flaschen	Greiner Bio-One, Deutschland
Petrischale, 150 mm	TPP, Schweiz
Objektträger	Carl Roth, Deutschland
Latexhandschuhe	Paul Hartmann, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Semperit, Österreich

### 2.1.3. Verwendete Chemikalien

	Art. Nr. = Artikelnummer
DAPI	Art. Nr. 18860.02, Serva, Deutschland
Agarose, Certified Low-Melt	Art. Nr. 161-3112, Bio-RAD, USA
Agarose, Certified Molecular Biology	Art. Nr. 161-3102, Bio-RAD, USA
Akasolv Aqua Care	Art. Nr. AN93.1, Carl Roth, Deutschland
Caspase inhibitor III	Art. Nr. 218745, Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Art. Nr. D2438, Sigma-Aldrich, Deutschland

## 2. Material und Methoden

EDTA-Na <sub>2</sub> Dihydrat	Art.Nr. 8043.2, Carl Roth, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS)	Art.Nr. 10270-106, Life Technologies, USA
FBS	Art.Nr. A15-101, PAA Laboratories, Österreich
FBS	Art.Nr. S 0115, Biochrom, Deutschland
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Art.Nr. 6943.1, Carl Roth, Deutschland
HEPES	Art.Nr. 9105.3, Carl Roth, Deutschland
Immersionsöl Type F	Art.Nr. 11513859, Leica Microsystems, Deutschland
KCl	Art.Nr. 6781.1, Carl Roth, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Art.Nr. 3904.1, Carl Roth, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Art.Nr. M8266, Sigma-Aldrich, Deutschland
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Art.Nr. 8.14715, Merck Schuchardt, Deutschland
NaCl	Art.Nr. HN00.2, Carl Roth, Deutschland
NaF	Art.Nr. S1504, Sigma-Aldrich, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Art.Nr. P030.2, Carl Roth, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Art.Nr. 106346, Merck, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Art.Nr. 6885.1, Carl Roth, Deutschland
ProLong <sup>®</sup> Gold antifade reagent	Art.Nr. P36930, Life Technologies, USA
Propidiumiodid	Art.Nr. 537059, Merck, Deutschland
Protease aus <i>Streptomyces</i> <i>griseus</i>	Art.Nr. P6911, Sigma-Aldrich, Deutschland
Ribonuklease A aus bovinem Pankreas	Art.Nr. R4875, Sigma-Aldrich, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Art.Nr. R6504-10L, Sigma-Aldrich, Deutschland
TRIS	Art.Nr. 4855.2, Carl Roth, Deutschland
Triton X 100	Art.Nr. 3051.2, Carl Roth, Deutschland
Wortmannin	Art.Nr. 350-020-M025, Alexis Biochemicals, USA

#### 2.1.4. Puffer und Lösungen

##### DAPI-Färbelösung

2 µg/ml DAPI

5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 M NaCl

0,1 M TRIS

0,05% Triton X 100

Aufgelöst in Aqua destillata (A.dest.).

##### Isoton II, pH 7,40

1,07 mM EDTA-Na<sub>2</sub> Dihydrat

5,36 mM KCL

135 mM NaCl

13,38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

7,14 mM NaF

1,45 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Aufgelöst in A.dest.

##### Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,40

2.7 mM KCl

1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

137 mM NaCl

7.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Aufgelöst in A.dest.

##### Propidiumiodid Färbelösung

62 µg/ml Ribonuklease A aus bovinem Pankreas

40 µg/ml Propidiumiodid

## 2. Material und Methoden

Aufgelöst in PBS.

### **Serumfreies HEPES gepuffertes Medium**

20 mM HEPES

5 mM NaHCO<sub>3</sub>

Aufgelöst in Medium.

### **Lyselösung, pH 7,60**

100 mM EDTA-Na<sub>2</sub> Dihydrat

50 mM NaCl

10 mM TRIS

2% N-Lauroylsarcosin Natriumsalz

0,2 mg/ml Protease aus *Streptomyces griseus*

Aufgelöst in A.dest., die Protease wurde erst kurz vor der Verwendung hinzugefügt.

### **Waschlösung, pH 7,60**

100 mM EDTA-Na<sub>2</sub> Dihydrat

50 mM NaCl

10 mM TRIS

Aufgelöst in A.dest.

### **Ribonukleaselösung, pH 7,60**

100 mM EDTA-Na<sub>2</sub> Dihydrat

50 mM NaCl

10 mM TRIS

0,1 mg/ml Ribonuklease A aus bovinem Pankreas

Aufgelöst in A.dest., die Ribonuklease wurde erst kurz vor der Verwendung hinzugefügt.



### 0,5 x TRIS-Borat-EDTA (TBE), pH 8,25

89 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$

2 mM EDTA- $\text{Na}_2$  Dihydrat

89 mM TRIS

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkulturen

Bei den in dieser Studie eingesetzten Zellen handelt es sich um den Wildtyp und verschiedene Knockout-Mutanten der Null Acute Leukemia - Minowada (NALM-6) Zelllinie. Es ist eine humane pre-B Zelllinie, die aus einem 19-jährigen Mann mit nicht-T, nicht-B akuter lymphoblastischer Leukämie gewonnen wurde [Hurwitz et al., 1979, Adachi et al., 2008]. Im Einzelnen handelt es sich um NALM S14 (Wildtyp), NALM N115 (LIG4 -/-), NALM 4-46 (Artemis -/-), NALM 3-41 (LIG4 -/-, Artemis -/-), NALM 52 (RAD54 -/-), NALM 96 (LIG4 -/-, RAD54 -/-) und NALM p53 (TP53 -/-). Die Zellen wurden in der Regel in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS von Life Technologies kultiviert. Andere Seren wurden zu Beginn ebenfalls getestet: FBS von Biochrom und FBS von PAA. Als Behälter wurden Petrischalen mit 100 mm Durchmesser verwendet (10 ml Zellsuspension pro Schale). Diese wiederum wurden zu mehreren in Kühlschrankschächten aufbewahrt. Jeder Kühlschrankschacht hatte ein Metallgitter eingelegt, unter dem sich Akasolv Aqua Care befand. Die Inkubation erfolgte in  $\text{CO}_2$ -Inkubatoren in feuchter Luft mit einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5%. Zur Bestimmung der Zellkonzentration und des durchschnittlichen Zelldurchmessers wurde eine Probe von 500  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen, mit 9,5 ml Isoton II verdünnt und mit dem Zellzähler gemessen.

### 2.2.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Messung der Zellzyklusphasen über den DNA-Gehalt pro Zelle durchgeführt. Um eine Probe für diese Messung zu erstellen, wurde Zellsuspension in einem 15 ml Kunststoffgefäß 5 Minuten lang mit 1500 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Präzipitat wurde daraufhin in 5 ml PBS gelöst und abermals 5 Minuten lang mit 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Präzipitat in 70% Ethanol gelöst und bei 4°C maximal 2 Wochen lang gelagert. Am Tag der Messung wurde 5 Minuten lang mit 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Präzipitat in Propidiumiodid Färbelösung gelöst. Danach wurde die Probe 15 Minuten lang in einem 37°C Wasserbad gehalten, bevor das Durchflusszytometer mit dieser beladen wurde. Der prozentuale Anteil der Zellen, der sich in den Zellzyklusphasen G1, S und G2 befindet, wurde mithilfe des Computerprogramms Multicycle (Phoenix Flow Systems Inc.) bestimmt.

### 2.2.3. Wachstumskurven

Um eine Wachstumskurve zu erstellen, wurde zuerst in einem 50 ml Kunststoffgefäß eine Zellsuspension erstellt, die die gewünschte initiale Zellkonzentration enthält, und diese dann auf Petrischalen mit 60 mm Durchmesser verteilt (5 ml pro Schale). Aus der Subkultur, aus der die Zellen für die Zellsuspension gewonnen wurden, wurde eine Probe für die Durchflusszytometrie erstellt. In zeitlichen Abständen von meistens ca. einem Tag wurde der Inhalt einer dieser Petrischalen gesammelt und die Zellkonzentration bestimmt, sowie eine Probe für die Durchflusszytometrie erstellt.

### 2.2.4. Bestrahlung

Für Bestrahlungen wurde die Röntgenröhre mit 320 kV und 10 mA betrieben. Um niederenergetische Strahlungsanteile zu absorbieren, wurde ein Aluminiumfilter mit einem

## 2. Material und Methoden

Durchmesser von 1,65 mm verwendet. Die effektive Photonenenergie betrug ca. 90 kV. Der Abstand zwischen Röntgenröhre und bestrahlter Petrischale betrug 500 mm, die Dosisrate ca. 2,76 Gy/min.

### 2.2.5. DNA-Reparaturexperiment

Die für ein DNA-Reparaturexperiment benutzten Zellen wurden drei Tage lang in Petrischalen mit 150 mm Durchmesser (40 ml pro Schale) kultiviert. Am Tag des Experimentes wurde zunächst die Zellkonzentration der aus den Petrischalen gewonnenen Zellsuspension gemessen und Proben für die Durchflusszytometrie entnommen. Zellsuspension, die für die Bestimmung der Dosiswirkung bestimmt war, wurde in eine Petrischale mit 100 mm Durchmesser pipettiert. Zellsuspension, die für die Messung der Reparaturkinetik vorgesehen war, wurde auf zwei Kunststoffbehälter aufgeteilt. Dem einen Behälter wurden in DMSO gelöster Caspase Inhibitor III und in DMSO gelöstes Wortmannin hinzugefügt. Dem anderen Behälter wurde ebenfalls Caspase Inhibitor III, aber kein Wortmannin, sondern nur zusätzliches DMSO hinzugefügt. Die Konzentration von Caspase Inhibitor III in der Zellsuspension betrug 200  $\mu\text{M}$ , die von Wortmannin 20  $\mu\text{M}$ . Daraufhin wurden beide Zellsuspensionen auf Petrischalen mit 35 mm Durchmesser verteilt (2 ml pro Schale). Die gesamte Prozedur von der Bestimmung der Zellkonzentration bis hierhin, wurde in einem Wärmerraum mit einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden alle Petrischalen im Inkubator gelagert, bis der Caspase Inhibitor III und das Wortmannin eine Stunde lang einwirken konnten.

Nachdem dieser Zeitraum erreicht wurde, wurden die 35 mm Petrischalen mit 20 Gy bei Raumtemperatur bestrahlt und anschließend wieder inkubiert. Zur Kontrolle wurden einige Petrischalen nicht bestrahlt, sondern lediglich gleichzeitig so lange bei Raumtemperatur aufbewahrt, wie eine Bestrahlung dauerte. Nach einer Dosis von 10 Gy wurde mit der Zeitmessung begonnen. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Petrischalen aus dem Inkubator herausgenommen, direkt auf Eis gestellt und ihr Inhalt in 15 ml

## 2. Material und Methoden

Kunststoffbehälter pipettiert, welche anschließend auf Eis gelagert wurden. Die niedrige Temperatur diente dazu, weitere DNA-Reparatur zu unterbinden. Jeder Kunststoffbehälter wurde 5 Minuten lang mit 1500 rpm in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Präzipitat in 5 ml auf Eis gestelltem PBS gelöst und die so entstandene Suspension abermals über 5 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert, mit anschließendem Absaugen des Überstandes. Dieses Präzipitat wiederum wurde so in auf Eis gestelltem serumfreiem mit HEPES gepuffertem Medium gelöst, dass eine Suspension mit  $6 \cdot 10^6$  Zellen/ml entstand. Diese Lösung wurde noch einmal mit der selben Menge auf 50°C vorgewärmtem serumfreiem HEPES gepuffertem Medium mit 1% certified low melt Agarose gemischt, so dass sich eine Suspension mit  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml ergab. Diese wurde in Glasröhrchen mit 3 mm Durchmesser pipettiert und für einige Minuten zum Erstarren des Agarosegels auf Eis gelegt. Danach wurde das Gel aus dem Röhrchen entfernt, auf eine durch Eis gekühlte Metallplatte gelegt und mit einem Skalpell in 5 mm lange zylinderförmige Blöcke geschnitten. Die Blöcke wurden in 12 ml Reagenzgläser mit Lyselösung (1 ml pro 2 Blöcke) hineingetaucht. Diese wurden verschlossen und bei 4°C gelagert. So entstanden Blöcke der Zeitpunkte 15 min, 30 min, 1, 2, 4 und 8 h, sowie Blöcke der Kontrollen bei 2 und 8 h.

Mit den Zellsuspensionen für die Bestimmung der Dosiswirkung wurde anders verfahren. Aus diesen wurden zuerst die Blöcke erstellt und diese in auf Eis gestellte, mit 5 ml serumfreiem HEPES gepuffertem Medium gefüllte 60 mm Petrischalen transferiert. Daraufhin wurden diese Petrischalen eisgekühlt bestrahlt. So wurden Blöcke mit 0, 10, 20, 30 und 40 Gy Strahlendosis erstellt, in Glasbehälter mit Lyselösung hineingetaucht, verschlossen und bei 4°C gelagert.

Nachdem alle Blöcke gesammelt worden waren, wurden die Glasbehälter 18 Stunden lang in einem 50°C Wasserbad gehalten. Die Lyselösung wurde daraufhin verworfen und mit Waschlösung (1 ml pro 2 Blöcke) ersetzt, woraufhin die Glasbehälter eine Stunde lang in 37°C warmem Wasser gebadet wurden. Anschließend wurde die Waschlösung entfernt und mit der gleichen Menge Ribonukleaselösung ersetzt. Nun wurden

## *2. Material und Methoden*

die Glasbehälter entweder eine Stunde lang in 37°C warmem Wasser gebadet und direkt auf Gele für die Pulsfeldgelelektrophorese aufgetragen, oder sie wurden wenige Tage lang in einem Kälteraum bei 4°C gelagert. Auf Abbildung 2.1., Seite 34, sind wichtige Arbeitsschritte des Reparatorexperimentes, mitsamt der dazugehörenden Pulsfeldgelelektrophorese, als Diagramm dargestellt.

### **2.2.6. Pulsfeldgelelektrophorese**

Die für die Pulsfeldgelelektrophorese verwendeten Gele wurden aus 0,5 x TBE, 0,5% certified molecular biology Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid erstellt. Sie wurden mit Blöcken beladen und die Taschen für die Blöcke mit einprozentiger certified molecular biology Agarose versiegelt. Die Gelelektrophoresekammern waren mit 0,5 x TBE gefüllt, welches durch einen stetigen Fluss durch ein Kühlaggregat bei einer Temperatur von ca. 8°C gehalten wurde. Während der 40 Stunden dauernden asymmetrischen Feldinversionsgelelektrophorese (AFIGE) wechselten sich Zyklen von 50 V (1,25 V/cm) für 900 Sekunden in Richtung der Migration der DNA mit Zyklen von 200 V (5,0 V/cm) für 75 Sekunden in die Gegenrichtung ab. Mit diesen Einstellungen wandern kleinere DNA-Fragmente größenabhängig unterschiedlich weit aus den Blöcken und bilden eine DNA-Spur, während sich größere unversehrte DNA kaum bewegt [Stamato, Denko, 1990]. Anschließend wurden die Gele mit dem Fluoreszenz Scanner gescannt.

### **2.2.7. Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse der DNA-Reparatorexperimente**

Der vom Fluoreszenz Scanner ausgegebene Scan wurde mit dem Computerprogramm ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) eingelesen. Zum Ermitteln, wieviel DNA aus einem Block ausgetreten ist, wurde wie folgt vorgegangen: Zum Ausgleichen der Farbe des Gels selbst, wurden sowohl der Bereich des Gels mit der zu diesem Block gehören-

## 2. Material und Methoden

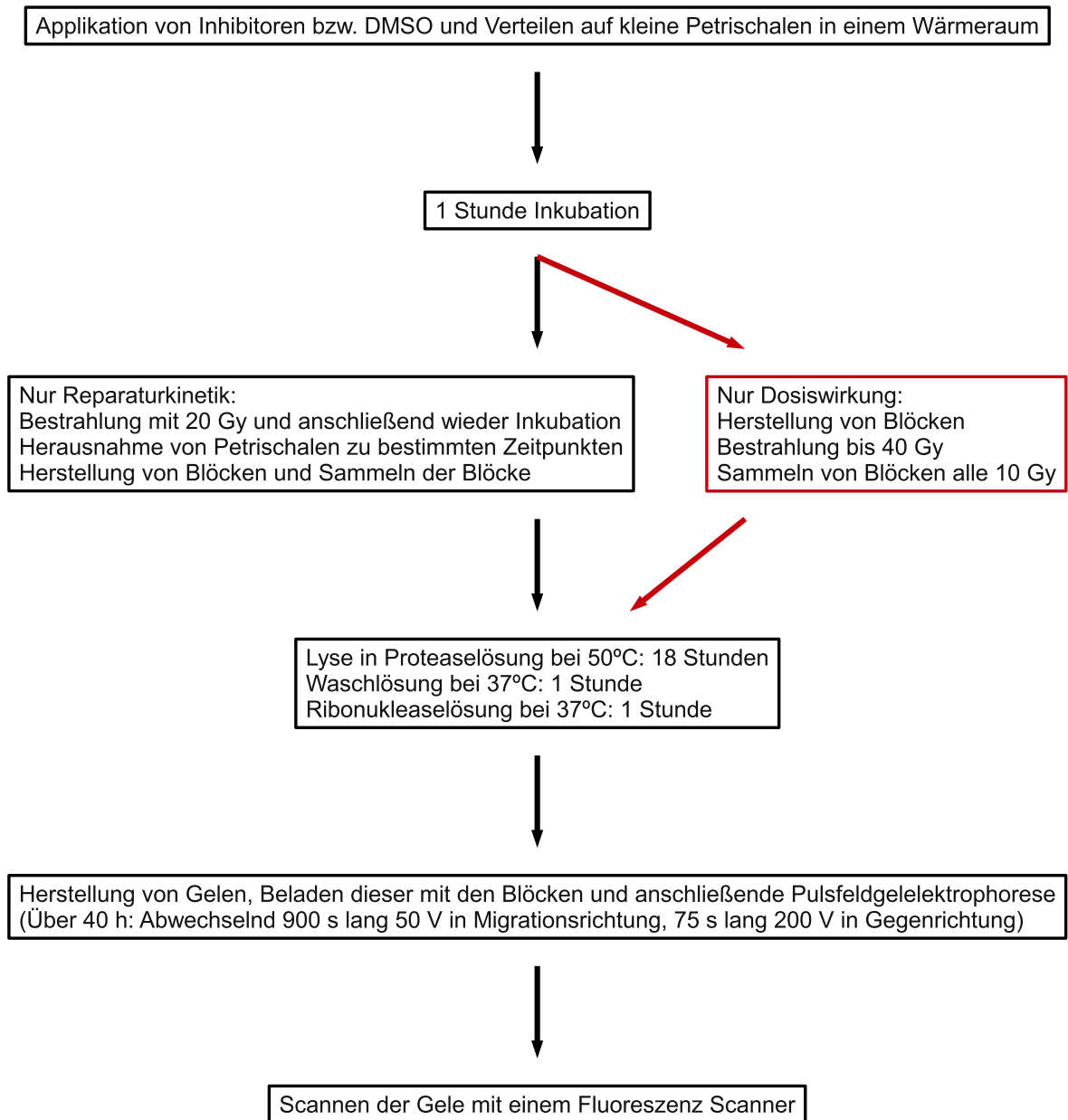


Abbildung 2.1.: Das Reparaturoperiment im Überblick.

## 2. Material und Methoden

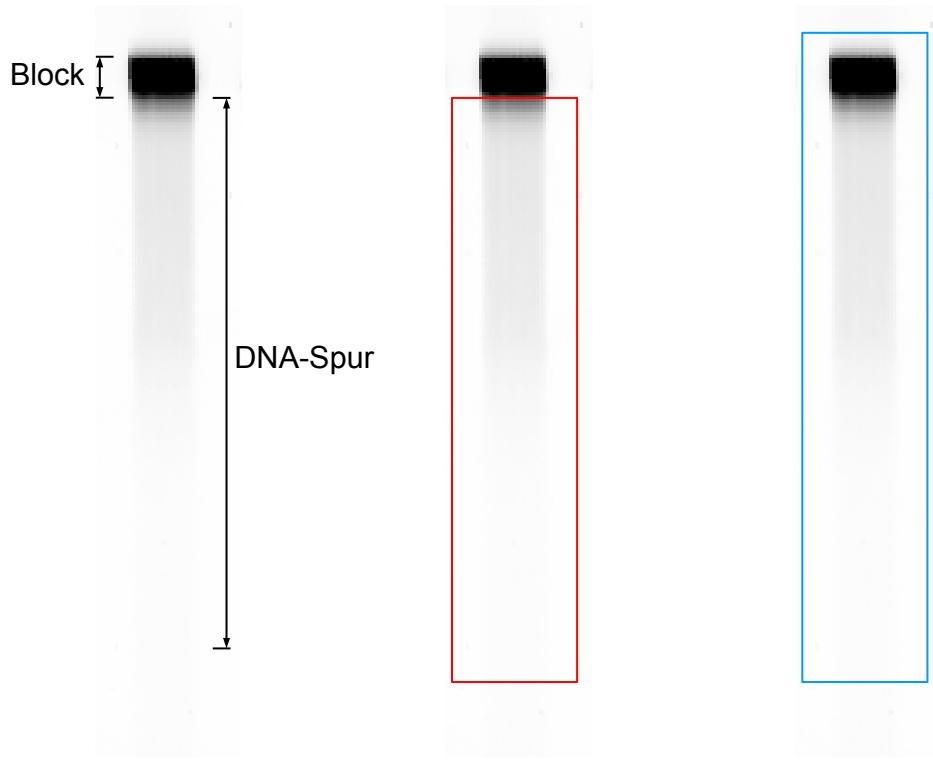


Abbildung 2.2.: **Bestimmung der FDR.** Es ist dreimal der gleiche Ausschnitt aus einem eingescannten Gel dargestellt. Rot umgrenzter Bereich dividiert durch blau umgrenzten Bereich = FDR.

den DNA-Spur, aber ohne Block, als auch der Bereich von DNA-Spur mitsamt Block erfasst und von diesen jeweils ebensogroße Bereiche des Gels ganz ohne DNA subtrahiert. Um einen prozentualen Wert zu erhalten, wurde das Ergebnis des Bereiches ohne Block durch das Ergebnis des Bereiches mit Block dividiert. Der so ermittelte Wert wird fraction of DNA released (FDR) genannt (siehe Abbildung 2.2., Seite 35). Er ist äquivalent zum Anteil der DNA-Doppelstrangbrüche, die nicht repariert wurden.

Um den Anteil des Strahleneinflusses an den unreparierten Doppelstrangbrüchen zu bestimmen, wurde von der FDR der bestrahlten Blöcke die FDR unbestrahlter Blöcke subtrahiert. So wurde von der FDR der Blöcke der Reparaturkinetik der Zeitpunkte 15 min, 30 min, 1, 2 und 4 h die FDR der 2 h Kontrolle abgezogen. Von der FDR des 8 h Blockes der Reparaturkinetik wurde die FDR der 8 h Kontrolle abgezogen. Und von der FDR der Blöcke zur Bestimmung der Dosiswirkung wurde die FDR von deren 0 Gy Block subtrahiert.

## 2. Material und Methoden

Die grafische Darstellung der Dosiswirkungskurve und der Kurven der Reparaturkinetik wurden mit dem Computerprogramm SigmaPlot 10.0 (Systat Software) erstellt. Jeder Messpunkt stellt einen arithmetischen Mittelwert aus in aller Regel 5 Blöcken eines Experimentes dar. Durch den zu einem Messpunkt gehörenden Balken wird die Standardabweichung dargestellt. Während bei der Dosiswirkungskurve die FDR gegen die Dosis in Gy aufgetragen wurde, wurde bei den Kurven der Reparaturkinetik die equivalent Gy dose ( $D_{eq}$ ) gegen die Zeit aufgetragen. Um die  $D_{eq}$  zu berechnen, wurde die Dosiswirkungskurve benutzt. Dazu wurde sie in 51 Einzelwerte von 0 bis 40 Gy unterteilt und für jede FDR der Messpunkte der Reparaturkinetik bestimmt, bei wieviel Gy ( $x$ ) diese FDR [ $f(x)$ ] auf der Dosiswirkungskurve liegt, indem der am nächsten liegende FDR-Wert aus den Einzelwerten herausgesucht wurde. Dann wurde  $x$  durch  $f(x)$  dividiert und das Resultat mit der tatsächlichen FDR der Blöcke der Reparaturkinetik multipliziert:  $D_{eq} = \frac{x}{f(x)} * FDR$ . Die Darstellung der  $D_{eq}$  hat die Vorteile, dass Kurven der Reparaturkinetik miteinander vergleichbar werden, auch wenn deren dazugehörige Dosiswirkungskurven verschieden sind, und nichtlineare Dosiswirkungskurven berücksichtigt werden.

Die durchgezogenen Graphen bei der Reparaturkinetik basieren auf den Algorithmen für nichtlineare Regression von SigmaPlot 10.0 mit der Ausgleichsrechnung  $f(x) = ae^{-bx} + ce^{-dx}$ . Es wurde also angenommen, dass zwei Komponenten – eine schnellere und eine langsamere – existieren. Dabei stehen  $a$  und  $c$  für die jeweilige Amplitude und  $b$  und  $d$  für die jeweilige Ratenkonstante.

### 2.2.8. Apoptosequantifizierung

Zum Bestimmen des Anteils apoptotischer Zellen, wurde zunächst genauso vorgegangen, wie für die Reparaturkinetik beim DNA-Reparaturexperiment. Die Zellkulturen wurden in Kunststoffbehältern gesammelt und Inhibitoren bzw. DMSO appliziert, woraufhin sie zu gleichen Teilen auf 35 mm Petrischalen verteilt, für eine Stunde inkubiert und bestrahlt wurden. Die zu bestimmten Zeitpunkten aus dem Inkubator herausge-



## 2. Material und Methoden

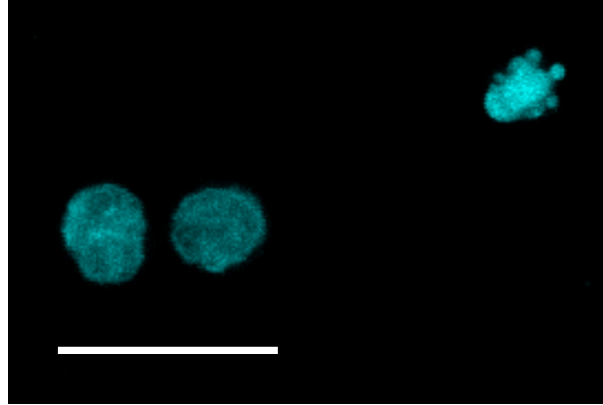


Abbildung 2.3.: **Scan dreier Zellkerne des NALM Wildtyps.** Der Maßstab umfasst 20  $\mu\text{m}$ . Die beiden Zellkerne auf der linken Seite geben keine Hinweise auf Apoptose. Der Zellkern auf der rechten Seite aber deutet aufgrund seiner stark verdichteten DNA und den bläschenartigen Formen auf Apoptose hin.

nommenen Petrischalen wurden direkt auf Eis gestellt und die in ihnen enthaltene Zellsuspension in 15 ml Kunststoffbehälter pipettiert, welche auf Eis gelagert wurden. Jeder Kunststoffbehälter wurde 5 Minuten lang mit 1500 rpm in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Präzipitat in 5 ml auf Eis gestelltem PBS gelöst und die so entstandene Suspension abermals über 5 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert, mit anschließendem Absaugen des Überstandes. Nun wurde das Präzipitat in 70% Ethanol gelöst und für einen Zeitraum von maximal einer Woche bei 4°C gelagert. Aus diesen Proben wurden mikroskopische Präparate erstellt. Dazu wurden die Kunststoffbehälter 5 Minuten lang mit 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in jeden Kunststoffbehälter 15  $\mu\text{l}$  DAPI-Färbelösung und 15  $\mu\text{l}$  ProLong<sup>®</sup> Gold antifade reagent hinzugefügt und das Präzipitat in diesen gelöst. 10  $\mu\text{l}$  Inhalt aus jeder Probe wurden jeweils auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

Nachdem die mikroskopischen Präparate lichtgeschützt für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelegen haben, wurde mit ihnen mikroskopiert. Dabei wurden die Präparate im konfokalen Mikroskop mit UV-Licht bestrahlt und mindestens 500 Zellkerne pro Präparat bei einer 630-fachen Vergrößerung dahingehend beurteilt, ob sie aufgrund einer

## *2. Material und Methoden*

DNA-Verdichtung und Zellkernspaltung auf Apoptose hindeuten oder nicht, so dass ein prozentualer Anteil auf diese Weise festgestellter apoptotischer Zellen angegeben werden konnte. Das UV-Licht lässt die mit DAPI-Färbelösung angefärbten Zellkerne blau aufleuchten. Ein Beispiel dafür, wie die Zellkerne durch das Mikroskop beobachtet aussehen, findet sich in Abbildung 2.3. auf Seite 37. Scans wurden mit dem Computerprogramm LAS AF 2.3.0 build 5131 (Leica Microsystems) durchgeführt, mit der das konfokale Mikroskop auch gesteuert wurde. Zweidimensionale Bilder wie das abgebildete wurden aus diesen dreidimensionalen Scans mit dem Computerprogramm Imaris 7.1.1 (Bitplane scientific solutions) erstellt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Wachstumskurven mit verschiedenen Seren

Um das Testsystem zu optimieren, ist es wichtig, das Wachstumsverhalten der Zellen zu kennen. Es kann sein, dass Zellen Seren unterschiedlich gut vertragen, was sich auf ihr Wachstum und ihre Stabilität auswirken kann. Deswegen wurden drei Seren gegeneinander getestet, um dann daraus dasjenige auszusuchen, welches die besten Resultate hervorbringt. Auf Abbildung 3.1. auf Seite 40 sind Wachstumskurven des Wildtyps der NALM Zellen abgebildet. Es wurden drei verschiedene Seren von drei unterschiedlichen Firmen verwendet und die Zellen mit einer initialen Konzentration von 0,3 M/ml (Millionen pro Milliliter) ausgesät. Zusätzlich, um einschätzen zu können, mit welcher initialen Konzentration man die Zellen passagieren sollte, damit diese immer in der Phase des exponentiellen Wachstums verbleiben, wurden bei einer FBS Sorte noch zwei weitere initiale Konzentrationen ausprobiert. Wachstumskurven sehen in der Regel so aus, dass Zellen, gegebenenfalls nach einer kurzen Verzögerungsphase, zunächst exponentiell wachsen und nach einer Zeitspanne, die abhängig von der Zelllinie und der Zelldichte ist, das exponentielle Wachstum nachlässt, da sich die zur Verfügung stehenden Nährstoffe und Wachstumsfaktoren und der zur Verfügung stehende Platz erschöpfen – die Zellen kommen zunehmend in die sogenannte Plateauphase. Mit weiter voranschreitender Zeit fangen dann zunehmend mehr Zellen an, abzusterben, so dass die gemessenen Zellkonzentrationen wieder abfallen. Bei einer Suspensionszelllinie wie den NALM ist zu beachten, dass auch abgestorbene Zellen mitgezählt werden, solange

### 3. Ergebnisse

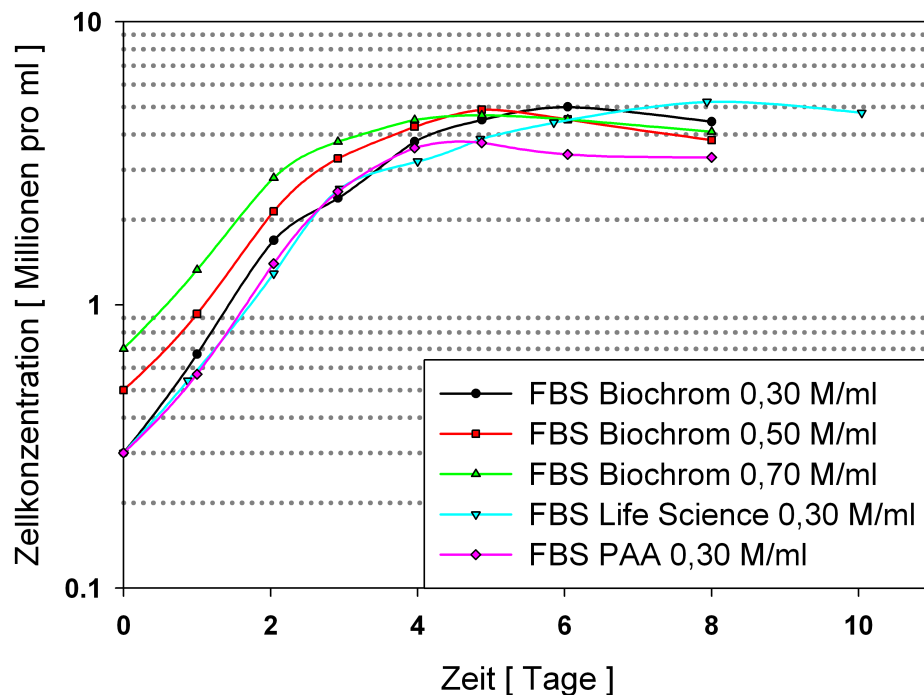


Abbildung 3.1.: **Logarithmische Darstellung von Wachstumskurven des NALM Wildtyps mit FBS von Biochrom, Life Science und PAA und drei verschiedenen initialen Zellkonzentrationen beim FBS von Biochrom.**

sie nicht zerfallen sind. Bei einer adhärent wachsenden Zelllinie dagegen lösen sich abgestorbene Zellen von der durch sie bewachsenen Oberfläche ab, weshalb sie zusammen mit dem Medium größtenteils abgesaugt und folglich nicht mitgemessen werden.

Man sieht bei den Biochrom Seren, dass die Zellkonzentration zunächst exponentiell zunimmt und die Zunahme von Tag 2 auf Tag 3 nachlässt. Dabei lässt diese zu diesem Zeitpunkt um so stärker nach, je höher die initiale Konzentration war. Bei den Seren von Life Science und PAA lässt die exponentielle Zunahme vom 3. auf den 4. Tag nach. Der Zeitpunkt, ab dem die gemessene Zellkonzentration abnimmt, wurde beim Serum von Life Science am spätesten erreicht.

In Abbildung 3.2. auf Seite 42 sind die Diagramme aus der Durchflusszytometrie für die mit dem Serum von Life Science behandelten Zellen zu sehen. Die X-Achse zeigt die gemessene Signalstärke pro gemessener Zelle, welche proportional zum DNA-Gehalt in dieser ist. Es konnte zwischen 1024 unterschiedlichen Signalstärken unterschieden

### 3. Ergebnisse

werden. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Für jede gemessene Signalstärke ist die Anzahl der Ereignisse mit dieser Signalstärke in grün aufgezeichnet. Die blaue Zahl links oben in jedem Diagramm gibt die höchste kumulative Anzahl an Ereignissen an, die einer Signalstärke zugeordnet wurden. In den beiden Diagrammen von Tag 1 sieht man zwei Peaks. Werte im Bereich des linken Peaks können Zellen in der G1-Phase und Werte im Bereich des rechten Peaks können Zellen in der G2-Phase zugeordnet werden (blaue Muster). Der Gipfel des Peaks bei G1 ist der höchste kumulative Wert – in diesem Falle 201. Werte aus dem Bereich zwischen den beiden Peaks können, wie aufgezeichnet, Zellen in der S-Phase zugeordnet werden (rosafarbenes Muster). Von Tag 3 auf Tag 4 hat der Anteil der Zellen in der G2-Phase stark abgenommen und wird mit Fortschreiten der Zeit noch geringer. Das ist ein Hinweis darauf, dass der Anteil proliferierender Zellen abnimmt. Links des Peaks bei G1 entsteht ein zunehmend höherer Subpeak: Bei immer mehr Zellen oder Zellfragmenten wurden Signalstärken erreicht, die einem DNA-Gehalt zugeordnet werden, der weniger als einem diploiden Chromosomensatz entspricht. Das ist ein Hinweis auf abgestorbene Zellen. Auch rechts des Peaks bei G2 gibt es Ereignisse. Sie kommen einerseits dadurch zustande, dass manchmal mehr als eine Zelle gleichzeitig gemessen wird, z.B. weil zwei Zellen dicht aneinanderhaften (Zelldoublette), andererseits können einige Zellen polyploid sein.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der anderen in dieser Studie abgebildeten Wachstumskurven finden sich auf Abbildung 3.3., Seite 43.

Alle drei getesteten Seren waren für die NALM Zellen geeignet. Aufgrund des relativ sanften Nachlassens des exponentiellen Wachstums und wegen dem am weitesten entfernt liegenden Zeitpunkt, ab dem die gemessene Zellkonzentration abnimmt, wurde das FBS von Life Science ausgewählt und alle NALM Zellen wurden von da an in diesem kultiviert.

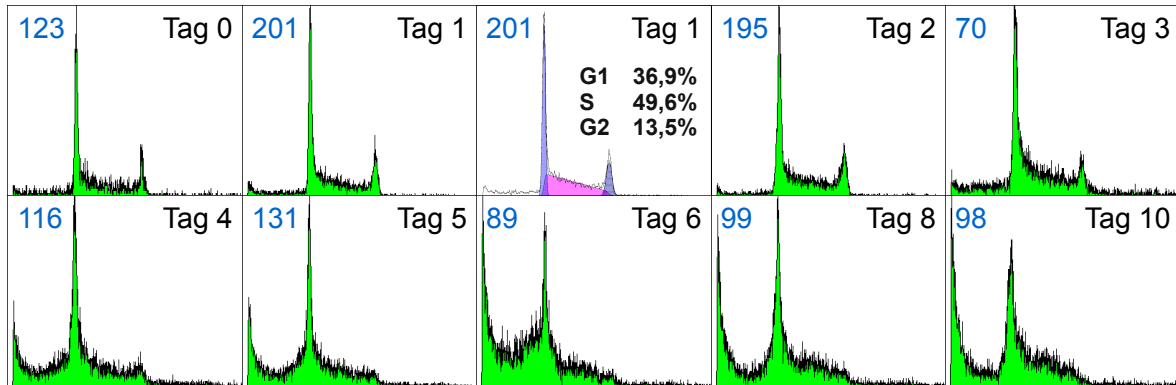


Abbildung 3.2.: Diagramme aus der Durchflusszytometrie zur Wachstumskurve des NALM Wildtyps mit FBS von Life Science und einer initialen Zellkonzentration von 0,3 M/ml. Tag 1 ist zweimal aufgeführt. Die rechte Variante zeigt die Aufteilung der Daten in die drei Zellzyklusphasen G1, S und G2 und die errechnete Zellzyklusverteilung.

### 3.2. Wachstumskurvenvergleich verschiedener NALM Mutanten

Das Wachstum des Wildtyps im Vergleich zu den Knockout-Mutanten könnte unterschiedlich sein. Um zu überprüfen, ob und wie stark es sich unterscheidet, wurden Wachstumskurven aller verwendeten Knockout-Mutanten erstellt, welche auf Abbildung 3.4. auf Seite 44 dargestellt sind. Alle Mutanten bekamen das FBS von Life Science und hatten eine initiale Zellkonzentration von 0,3 M/ml. Zum Vergleich wurden die Daten für den Wildtyp, wie bereits aus Abbildung 3.1. auf Seite 40 bekannt, ebenfalls aufgetragen. Man sieht, dass die Zellkonzentration bei allen NALM Varianten ungefähr bis zum 3. Tag exponentiell zunimmt, bevor diese Zunahme in späteren Zeitpunkten nachlässt. Das Nachlassen war bei allen Knockout-Mutanten relativ gleich stark und etwas stärker als beim Wildtyp. Alle Mutanten vertragen das FBS von Life Science gut. Da sich die Wachstumskurven im Zeitraum des exponentiellen Wachstums kaum voneinander unterscheiden, wurde beschlossen, alle Zellen mit gleichen Konzentrationen zu passagieren.

### 3. Ergebnisse

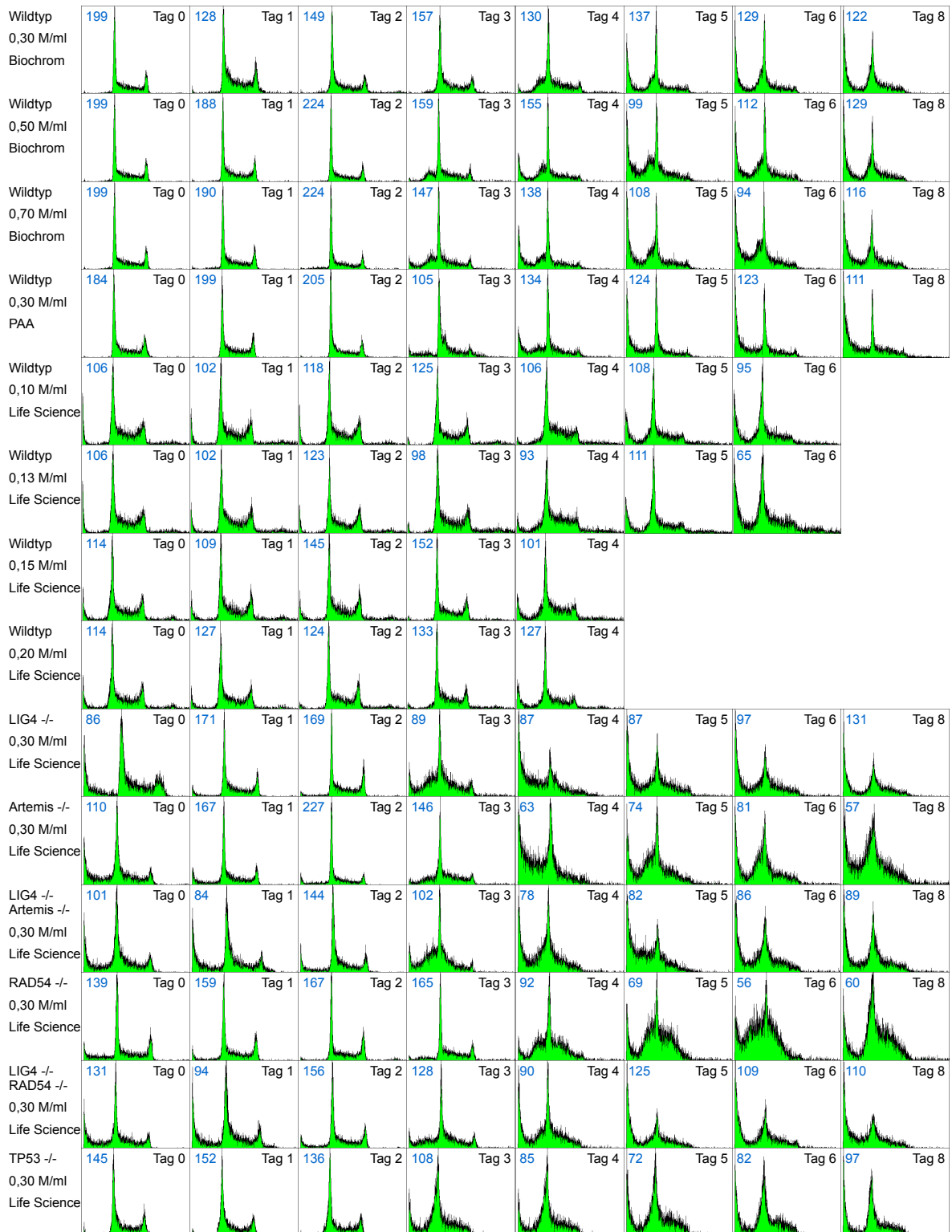


Abbildung 3.3.: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Wachstumskurven.

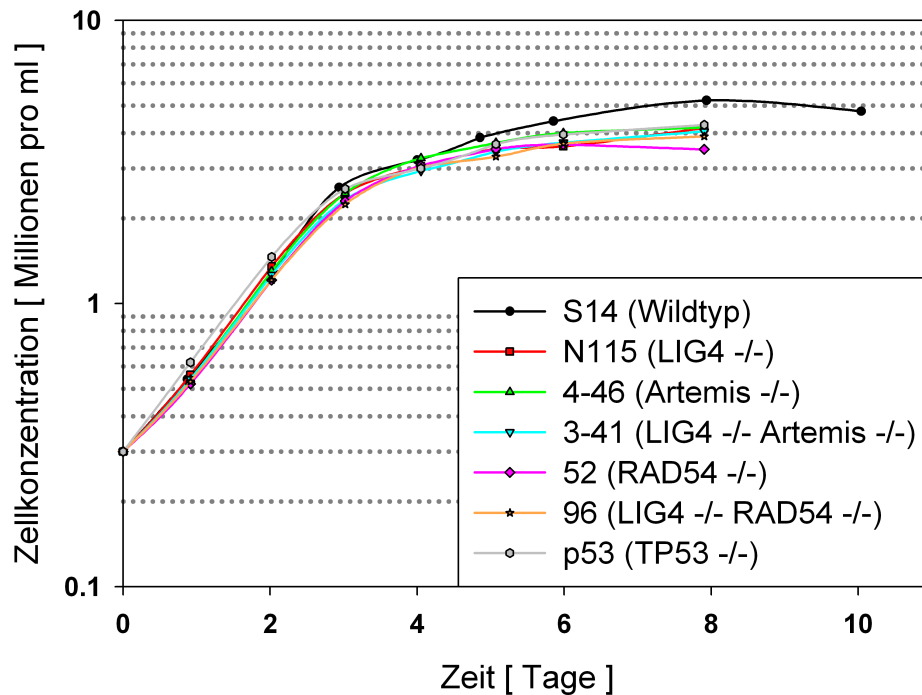


Abbildung 3.4.: **Logarithmische Darstellung von Wachstumskurven verschiedener NALM Knockout-Mutanten.** Verwendet wurde das FBS von Life Science. Die initiale Zellkonzentration betrug 0,3 M/ml.

### 3.3. Wachstumskurven mit verschiedenen initialen Zellkonzentrationen

Für die Reparatorexperimente war ein exponentielles Wachstum erwünscht. Diese sollten ca. drei Tage nach der Passage durchgeführt werden, und den Zellen ausreichend Zeit zu geben, sich von den Manipulationen bei der Passage zu erholen. Bei einer initialen Zellkonzentration von 0,3 M/ml schien dieser Zeitpunkt grenzwertig (siehe Abbildung 3.4., Seite 44). Daher wurden Wachstumskurven des Wildtyps mit geringeren initialen Zellkonzentrationen angefertigt. Da der Wildtyp zum Zeitpunkt von 3 Tagen die höchste Zellkonzentration erreichte, wurde dieser als Referenz genommen. Auf Abbildung 3.5. auf Seite 45 sind Wachstumskurven von diesem mit vier verschiedenen initialen Zellkonzentrationen zu sehen. Ab einer Verringerung der initialen Zellkonzentration auf 0,13 M/ml steigt die Zellkonzentration bis zum 4. Tag exponentiell. Deswegen kann man bei einer Durchführung von Reparatorexperimenten am 3. Tag



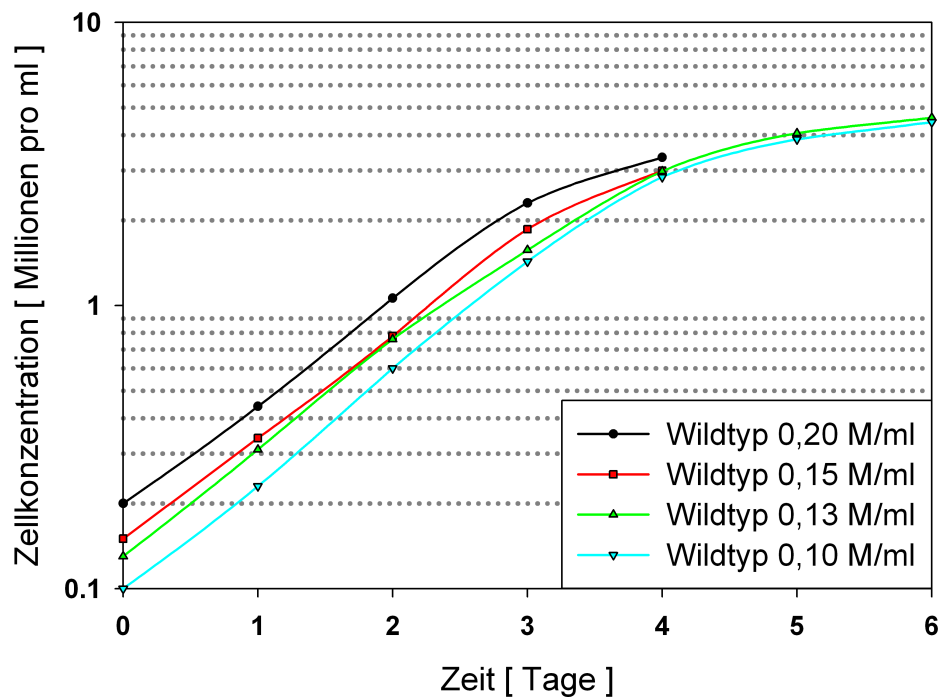


Abbildung 3.5.: **Logarithmische Darstellung von Wachstumskurven des NALM Wildtyps mit verschiedenen initialen Zellkonzentrationen.** Das FBS war von Life Science.

davon ausgehen, dass sich die Zellen in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, zeitlich noch weit von einem Abnahme des selbigen entfernt. Diese Konzentration wurde für die Passagen aller NALM Zellen übernommen und die Passagen wurden alle drei Tage durchgeführt.

### 3.4. Messung der Reparaturkinetik bei NALM Zellen

Um zu testen, ob NALM Zellen für die Messung der Reparaturkinetik mit der Pulsfeldgelelektrophorese geeignet sind, wurde zunächst ein Vorexperiment mit dem Wildtyp durchgeführt. Dieses erste DNA-Reparaturexperiment unterschied sich dahingehend von der Beschreibung unter Materialien und Methoden (siehe Abschnitt 2.2.5., Seite 31), dass die Verteilung auf 35 mm Petrischalen nicht in einem Wärmerraum bei 37°C, sondern in einer Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur stattfand. Erfahrungen in diesem Labor haben gezeigt, dass Zelllinien, die sehr empfindlich auf die Bestrahlung

### 3. Ergebnisse

reagieren, mit Apoptoseinhibitoren behandelt werden können, um Messungen dennoch durchführen zu können. Um zu testen, ob NALM Zellen von einer Zugabe solcher Inhibitoren profitieren, wurde eine Messreihe mit Caspase Inhibitor III (Boc-D-FMK [D’Mello et al., 1998]) und eine ohne Inhibitor, sondern stattdessen mit einer äquivalenten Menge DMSO durchgeführt. Abbildung 3.6. auf Seite 47 zeigt einen Ausschnitt des Scans des aus diesem Experiment resultierten Gels. Man sieht in der oberen Reihe die Blöcke und DNA-Spuren der Messreihe ohne Caspase Inhibitor III und darunter die der Messreihe mit Caspase Inhibitor III. Links sind zunächst die Blöcke und DNA-Spuren zur Bestimmung der Dosiswirkung und rechts davon die Blöcke und DNA-Spuren zur Bestimmung der Reparaturkinetik mit ansteigender Zeitdauer, gefolgt von zwei Kontrollen. Es ist zu erkennen, dass für die Zeitpunkte 4, 6 und 8 Stunden der Messreihe ohne Inhibitor der Inhalt der Blöcke zum größten Teil ausgetreten ist, weshalb diese besonders hell erscheinen, und dass bei diesen Blöcken eine besonders kräftige DNA-Spur entstanden ist. Dieser Effekt ist ein Hinweis dafür, dass die Menge großer DNA-Stränge im Block in Relation zu den Blöcken der anderen Messpunkte stark abgenommen hat. Das könnte ein Hinweis auf Apoptose sein, da Zellen in der Apoptose ihre DNA fragmentieren [Nagata et al., 2003]. Das Nichtauftreten dieses Effektes in der Messreihe mit Inhibitor bekräftigt diese Vermutung. Letztere gibt keine Hinweise auf Probleme.

Da sich herausgestellt hat, dass NALM Zellen sensibel auf Bestrahlung reagieren, wurde beschlossen, sie vor der Bestrahlung möglichst zu schonen, weshalb die Applikation von Inhibitoren und die Verteilung auf 35 mm Petrischalen nachfolgend immer in einem Wärmerraum bei 37°C durchgeführt wurde. Desweiteren erschien die Zugabe von Caspase Inhibitor III als notwendig, um die Reparaturkinetik messen zu können.

#### **3.4.1. Messung der Reparaturkinetik von NALM Zellen nach der exponentiellen Wachstumsphase**

Es wurde auch getestet, ob NALM Zellen, die sich nicht mehr im exponentiellen Wachstum befinden, für die Messung der Reparaturkinetik mit der Pulsfeldgelelektrophorese

### 3. Ergebnisse

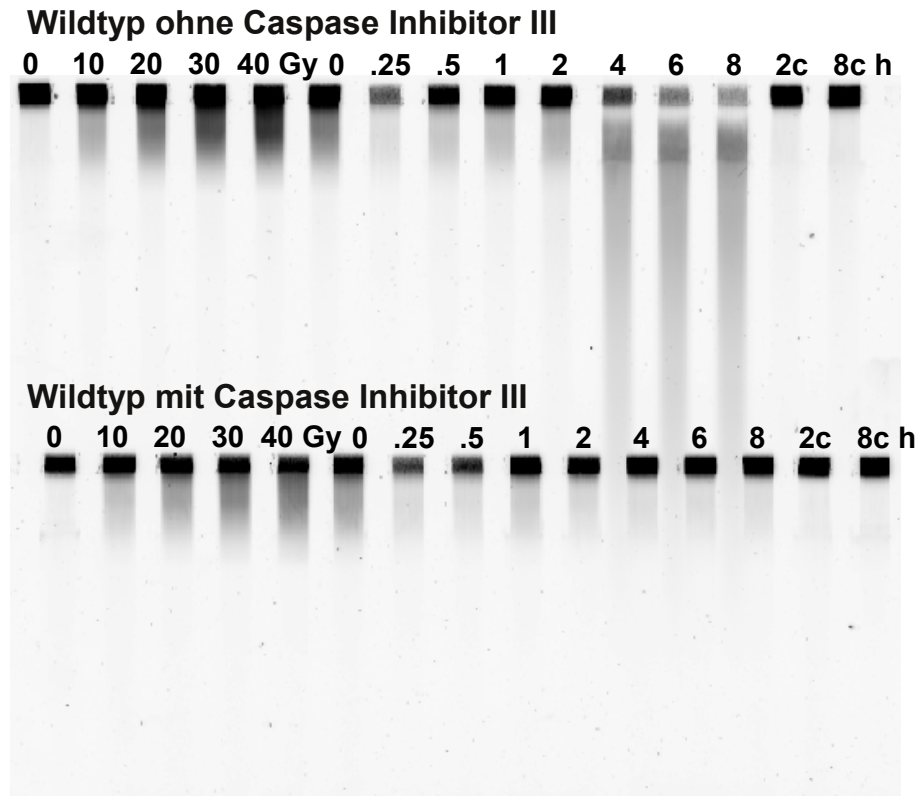


Abbildung 3.6.: **Gelscan eines DNA-Reparaturexperimentes des NALM Wildtyps mit und ohne Caspase Inhibitor III.** Die ersten fünf Blöcke dienen der Bestimmung der Dosiswirkung mit 0 bis 40 Gy. Die nachfolgenden Blöcke dienen der Bestimmung der Reparaturkinetik nach einer Bestrahlung mit 20 Gy. Der jeweilige Zeitpunkt ist in Stunden angegeben (h). Das c steht für Kontrolle. Die Konzentration des Caspase Inhibitors betrug 200  $\mu$ M.

eigenen. Dazu wurde mit dem NALM Wildtyp und einem DNA Ligase IV defizienten Knockout-Mutanten ein Reparaturrexperiment durchgeführt, wie es unter Abschnitt 2.2.5., Seite 31, beschrieben ist. Die Zellen stammen aus dem 5. Tag nach ihrer Passage mit einer initialen Zellkonzentration von 0,13 M/ml. Abbildung 3.7., Seite 48, zeigt einen Ausschnitt aus einem der Gele, die aus diesem Experiment resultierten, und die Dosiswirkungskurven. Man sieht, dass die Messwerte der einzelnen Blöcke eines Messpunktes stark voneinander abweichen, was in einem breiten Fehlerbalken deutlich wird. So umfasst er beim Wildtyp bei 30 Gy beispielsweise eine FDR von unter 30 bis über 60%. Ein solches Ergebnis ist wenig brauchbar. Es deutet aber auf ein Problem mit den Zellen hin. Auf eine Bestimmung der Reparaturkinetik wurde hier verzichtet.

### 3. Ergebnisse

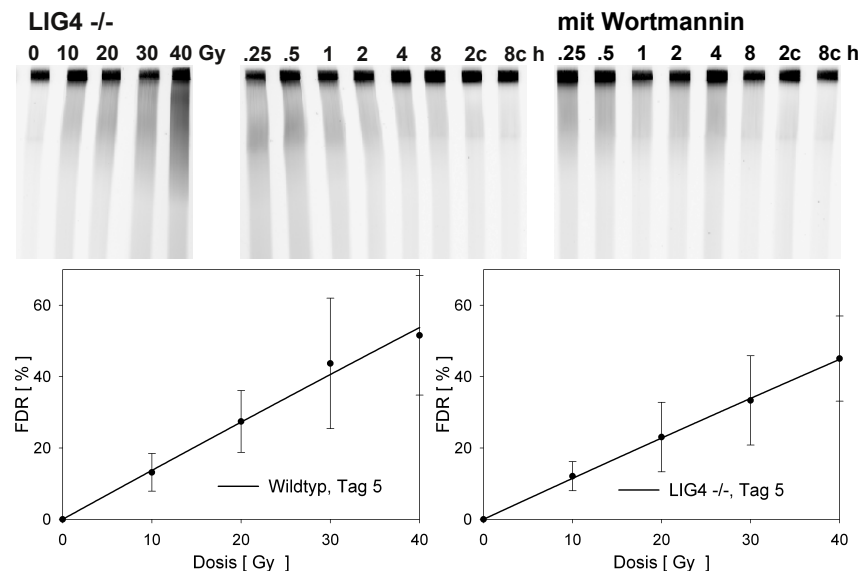


Abbildung 3.7.: **Resultate eines DNA-Reparaturexperimentes mit Zellen aus dem 5. Tag ihrer Passage mit einer initialen Zellkonzentration von 0,13 M/ml.** Oben sieht man einen Gelscan DNA Ligase IV defizienter NALM Zellen. Wortmannin (20 µM) wurde zur Inhibition von DNA-PK eingesetzt. Unten sind die Dosiswirkungskurve dieser Zellen und die des NALM Wildtyps abgebildet. Man beachte die Skalierung der y-Achse bis 70%. Die anderen in diesem Dokument abgebildeten Dosiswirkungskurven haben eine Skalierung bis 50%.

## 3.5. Apoptosequantifizierung

Da es im DNA-Reparaturvorexperiment einen Hinweis auf das Auftreten von Apoptose gab, wurde diese Möglichkeit untersucht, indem der Anteil apoptotischer Zellen quantifiziert wurde. Dazu wurde genauso wie für die Messung der Reparaturkinetik bei einem DNA-Reparaturexperiment vorgegangen, nur wurden nicht Blöcke für die Pulsfeldgelelektrophorese, sondern mikroskopische Präparate erstellt. Für Einzelheiten siehe Abschnitt 2.2.8., Seite 36. Da in den DNA-Reparaturexperimenten der DNA-PK-Inhibitor Wortmannin Verwendung findet, um das NHEJ zu hemmen und dadurch die Kinetik verbliebener Reparaturmechanismen darzustellen, wurde auch getestet, ob dieser eine schädliche Wirkung auf die Zellen hat [Hashimoto et al., 2003]. Abbildung 3.8. auf Seite 50 zeigt das Resultat für den NALM Wildtyp. Bei diesem Experiment wurden verschiedene Behandlungen dieser Zellen durchgeführt, was insgesamt 8 verschiedene Zustände ergab: Mit/ohne Bestrahlung, mit/ohne Wortmannin und mit/ohne Caspase Inhibitor III. Wenn ein Inhibitor nicht verabreicht wurde, wurde stattdessen eine äquivalente Menge seines Lösungsmittels DMSO appliziert.

Bei unbestrahlten Zellen ohne Caspase Inhibitor III bleibt der Anteil apoptotischer Zellen bis zum Zeitpunkt von 8 Stunden auf dem Niveau des niedrigen Ausgangswertes. Beim 24 Stunden Zeitpunkt hat er deutlich zugenommen und nimmt bis zum 48 Stunden Zeitpunkt weiter kräftig zu. Wurden die Zellen dagegen bestrahlt, nimmt der Anteil apoptotischer Zellen schon zum 2 Stunden Zeitpunkt hin deutlich zu. Bei 4 Stunden sind ca. 81% und beim 8 Stunden Zeitpunkt ca. 96% der Zellen in Apoptose gegangen.

Unbestrahlte Zellen ohne Caspase Inhibitor III, aber mit Wortmannin-Zugabe, haben bereits zum Zeitpunkt 0 einen höheren Anteil apoptotischer Zellen. Zu diesem Zeitpunkt hatten sie bereits etwas über eine Stunde lang Kontakt mit Wortmannin. Im weiteren Zeitverlauf nimmt hier der Anteil apoptotischer Zellen auch ohne Bestrahlung zunächst auf über 50% bis zum 2 Stunden Zeitpunkt zu und steigt danach viel langsamer, aber stetig an. Bei Bestrahlung lässt sich ab dem 4 Stunden Zeitpunkt ein

### 3. Ergebnisse

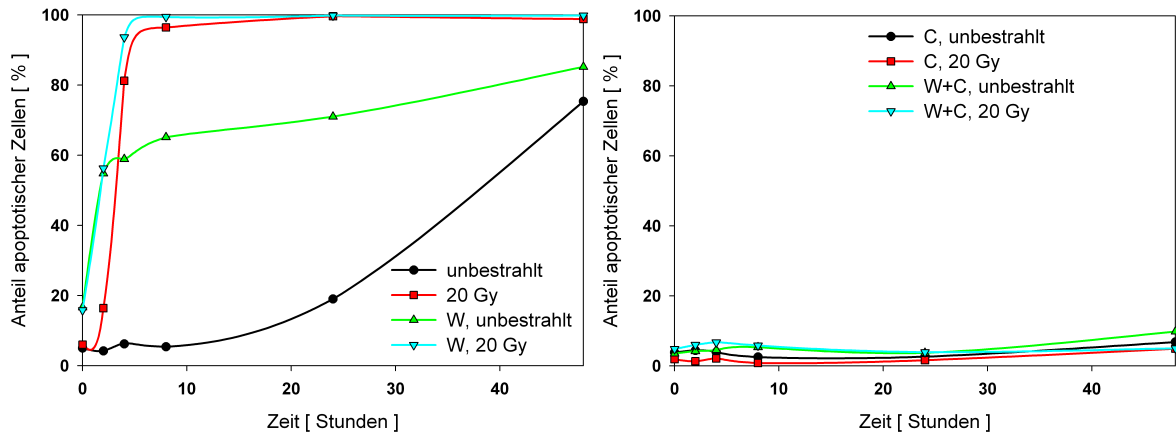


Abbildung 3.8.: **Apoptose beim NALM Wildtyp.** Im linken Diagramm ohne Caspase Inhibitor III Zugabe und rechts mit Caspase Inhibitor III Zugabe, 200  $\mu$ M (C). W steht für die Applikation von 20  $\mu$ M Wortmannin.

höherer Anteil als ohne Bestrahlung messen, der mit fast 94% sehr hoch ist. In den nachfolgenden Zeitpunkten gibt es kaum noch Zellen, die nicht in Apoptose gegangen sind.

Wurden die Zellen mit Caspase Inhibitor III behandelt, so bleibt der Anteil an Zellen mit morphologischen Hinweisen auf Apoptose über den gesamten gemessenen Zeitraum gering - unabhängig von Bestrahlung oder Wortmanninzugabe.

Abbildung 3.9. auf Seite 51 zeigt den Scan eines mikroskopischen Präparates der bestrahlten Zellen mit Caspase Inhibitor III und Abbildung 3.10. auf Seite 52 ohne Caspase Inhibitor III, jeweils 8 Stunden nach Bestrahlung und ohne Wortmanninzugabe. Während beim Präparat der Zellen mit Inhibitor nur sehr wenige Zellkerne Hinweise auf Apoptose gaben, deuteten beim Präparat ohne Inhibitor nahezu alle Zellkerne auf Apoptose hin.

Es wurde überprüft, ob der Anteil apoptotischer Zellen auch bei den Knockout-Mutanten über den gesamten Zeitraum von Reparatorexperimenten gleichbleibt, wenn diese mit Caspase Inhibitor III und gegebenenfalls Wortmannin behandelt wurden. Abbildung 3.11. auf Seite 52 zeigt die Ergebnisse. Über den gesamten Zeitraum von 8 Stunden bleibt der Anteil apoptotischer Zellen in jeder NALM Variante gleich und auf einem niedrigen Niveau, sowohl mit als auch ohne Wortmanninzugabe.

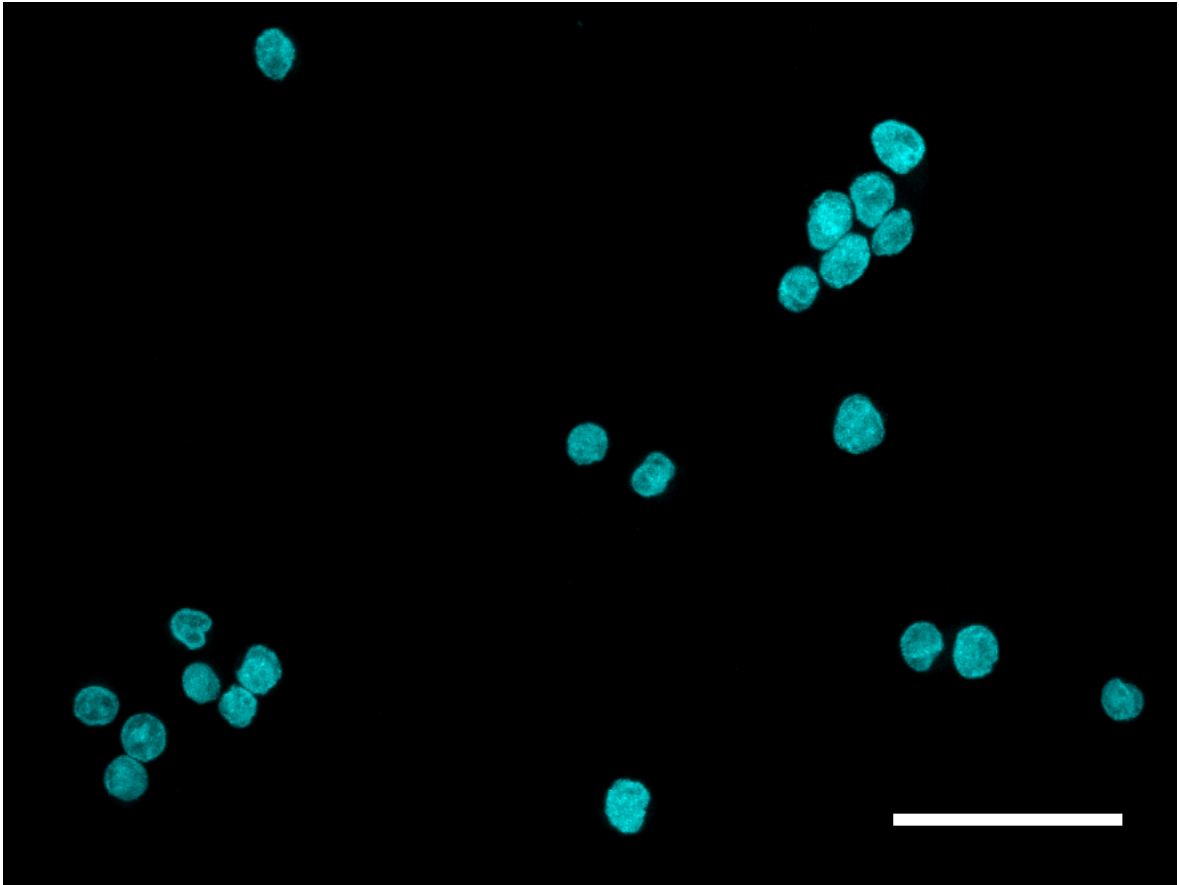


Abbildung 3.9.: **Scan eines mikroskopischen Präparates des mit Caspase Inhibitor III behandelten NALM Wildtyps, 8 Stunden nach Bestrahlung mit 20 Gy.** DAPI-Färbung unter UV-Licht. Der Maßstab umfasst 40  $\mu\text{m}$ . Die Konzentration des Caspase Inhibitors betrug 200  $\mu\text{M}$ . Die abgebildeten Zellkerne zeigen keine Anzeichen von Apoptose.

### 3. Ergebnisse

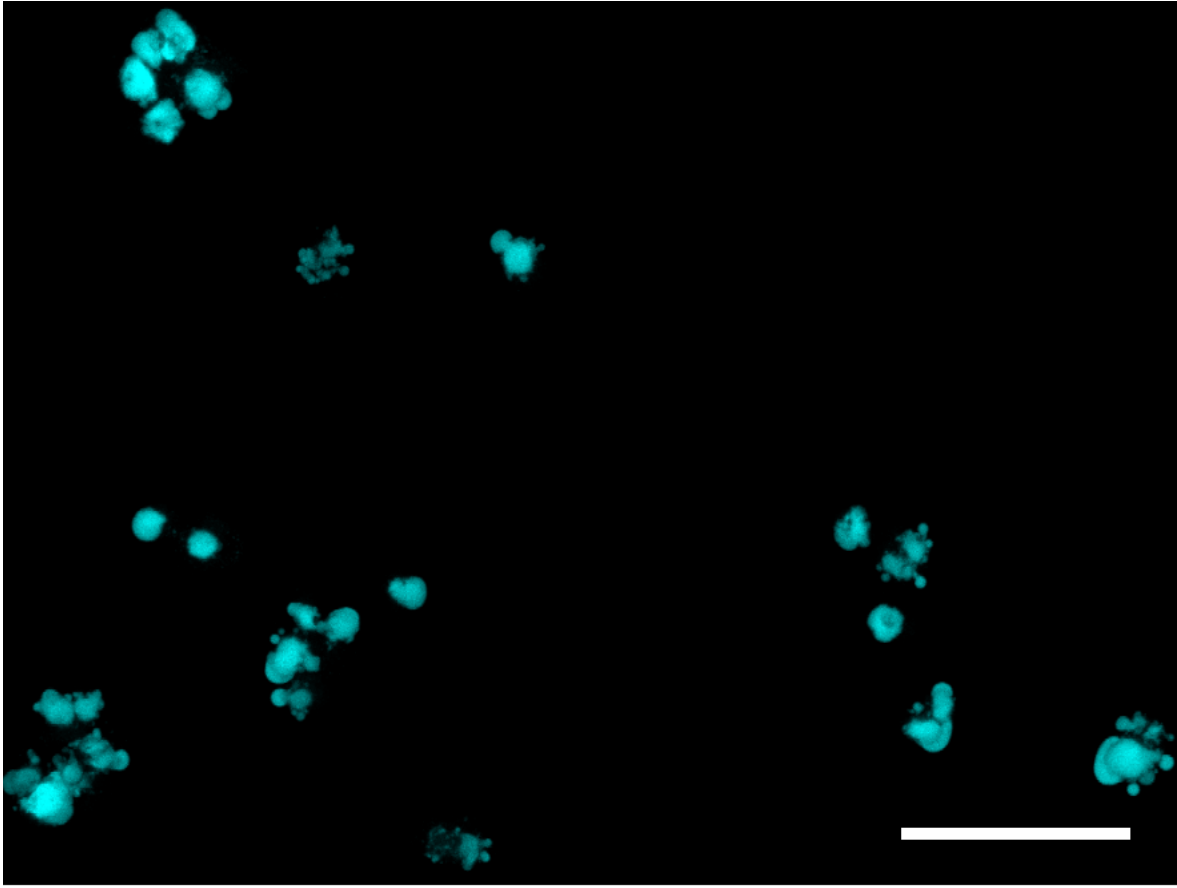


Abbildung 3.10.: **Scan eines mikroskopischen Präparates des NALM Wildtyps ohne Zugabe von Caspase Inhibitor III, 8 Stunden nach Bestrahlung mit 20 Gy.** DAPI-Färbung unter UV-Licht. Der Maßstab zeigt eine Länge von 40  $\mu\text{m}$ . Die Zellen aller abgebildeten Zellkerne sind in Apoptose gegangen.

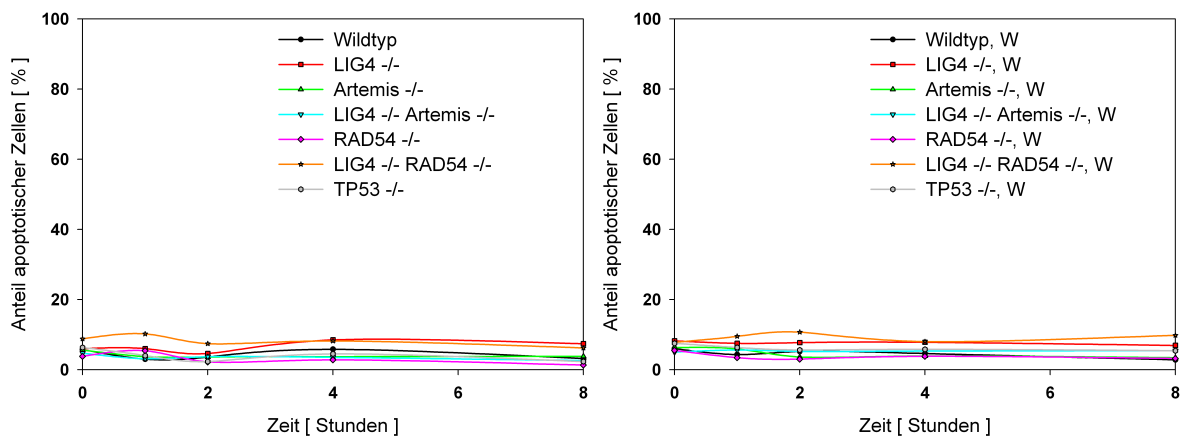


Abbildung 3.11.: **Apoptose des Wildtyps und der NALM Knockout-Mutanten unter Bedingungen wie bei DNA-Reparaturexperimenten.** Links ohne und rechts mit Wortmanninzugabe (W), 20  $\mu\text{M}$ .



## 3.6. Reparaturkinetik des NALM Wildtyps

Nachdem die zur Untersuchung der DNA-Reparatur bei NALM Zellen nötige Vorgehensweise ermittelt wurde, wurden DNA-Reparaturexperimente so, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.5., Seite 31). Abbildung 3.12. auf Seite 54 zeigt das Resultat des DNA-Reparaturexperimentes des NALM Wildtyps. Dargestellt sind oben links zunächst exemplarische Ausschnitte eines Gelscans. Daneben sieht man das Histogramm aus der Durchflusszytometrie, das die Verteilung der Zellzyklusphasen zu Beginn des Experimentes zeigt. Es bestätigt, dass sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. In dieser Darstellung ist eingezeichnet, welche Anteile das Computerprogramm Multicycle welcher Zellzyklusphase zugewiesen hat. Die entsprechenden Werte sind angegeben. Unten links ist die Dosiswirkungskurve abgebildet. Es ist zu beobachten, dass mit zunehmender Strahlendosis auch zunehmend mehr DNA aus den Blöcken in das Gel gewandert ist, was eine dosisabhängige Zunahme von DSBs demonstriert. Die Dosiswirkungskurve ist beim NALM Wildtyp bis 30 Gy linear. Von 30 auf 40 Gy nimmt die FDR aber schwächer zu. Doch liegt der nichtlineare Abschnitt weit von den 20 Gy Strahlendosis für die Reparaturkinetik entfernt.

Rechts neben der Dosiswirkungskurve sieht man die Reparaturkinetik mit und ohne Wortmanninzugabe. Die Wortmanninzugabe erfolgte, damit das NHEJ blockiert wird und man dadurch die Kinetik anderer DSB-Reparaturmechanismen besser untersuchen kann. Das sind im Wesentlichen die HR und das B-NHEJ. Nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 20 Gy nimmt die  $D_{eq}$  abhängig von der Zeit ab, was die Reparatur von DSBs widerspiegelt. Man sieht, dass der Wildtyp effizient repariert – zuerst sehr schnell und ab ca. 2 Stunden langsamer. Bereits nach einer Stunde wurden ca. die Hälfte der DNA-Doppelstrangbrüche repariert, nach 8 Stunden ungefähr drei Viertel. Nach Inhibition von DNA-PK mit Wortmannin ist die Reparaturkinetik wesentlich langsamer. Die schnelle Komponente ist nur zwischen dem Zeitpunkt 0 und 15 min beobachtbar. Danach ist die Reparatur zwar relativ langsam, schreitet aber stetig voran

### 3. Ergebnisse

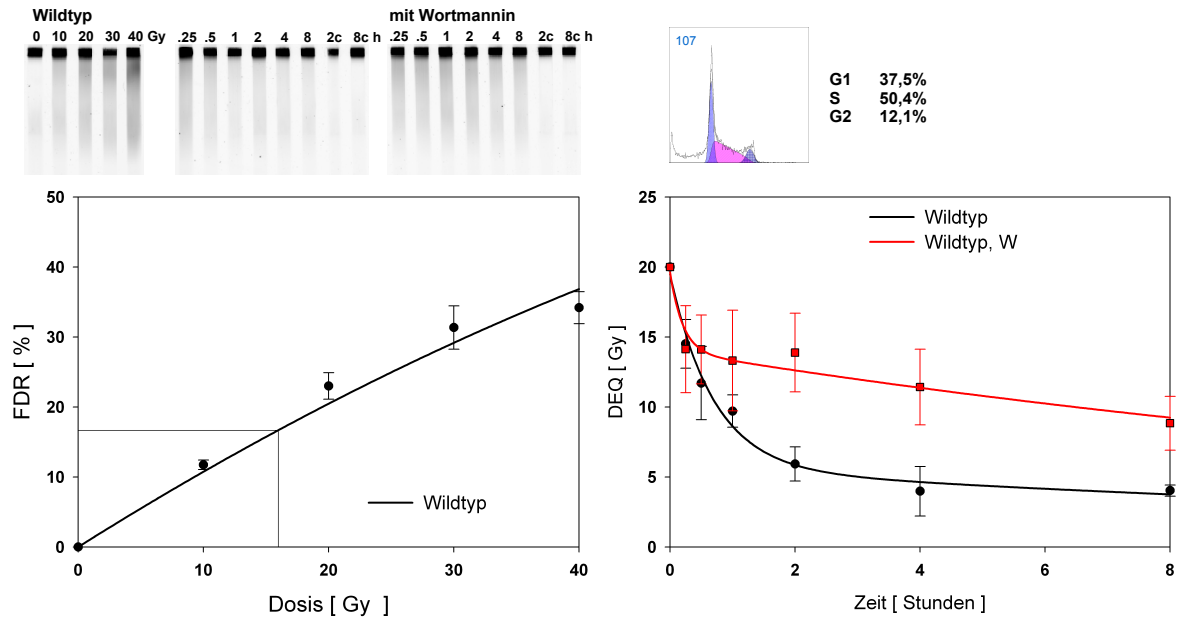


Abbildung 3.12.: **Reparaturkinetik röntgenstrahleninduzierter DSBs des NALM Wildtyps.** Oben links sieht man Scans eines Gels, aus dem DNA-Reparaturexperiment. Oben rechts ist zu sehen, wie das Computerprogramm Multicycle die Daten aus der Durchflusszytometrie den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2 zuweist und welche Zellzyklusverteilung es daraus errechnet hat. Die Zellen für diese Messung stammen vom Beginn des Experimentes. Daten von Zelldoubletten wurden herausgefiltert. Die Zahl innerhalb des Diagramms gibt den höchsten Wert an, den ein Kanal erreichte. Unten links ist die Dosiswirkungskurve. Zur Veranschaulichung, wie die Werte für die  $D_{eq}$  aus der Dosiswirkungskurve ermittelt werden, ist in dieser mit zwei Linien eingezeichnet, wie ein  $D_{eq}$  von 16 Gy aus einer FDR von 16,70% bestimmt wird. Unten rechts sieht man die Reparaturkinetik ohne und mit Wortmanninzugabe (W), 20  $\mu$ M. Die Strahlendosis betrug 20 Gy.

und nach 8 Stunden ist ungefähr die Hälfte der Doppelstrangbrüche repariert worden. Das ist zwar wesentlich weniger als die Zellen ohne DNA-PK-Inhibition schafften, zeugt aber von der Effizienz, die verbleibt, nachdem das NHEJ blockiert wurde.

## 3.7. Reparaturkinetik DNA Ligase IV und Artemis-defizienter NALM Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, ist DNA Ligase IV am kritischen letzten Schritt des NHEJs beteiligt: Dem entgültigen Verbinden der DNA-Enden miteinander (siehe Abschnitt 1.1.3., Seite 11). Artemis wiederum ist ein sehr versatiler Modifikator der DNA-Enden, der diese – falls nötig – vor der Ligation so verändern kann, dass diese überhaupt erst ligierbar werden (siehe Abschnitt 1.1.2., Seite 9). Es wurden Zellen untersucht, bei denen DNA Ligase IV ausgeschaltet wurde, Zellen, bei denen Artemis ausgeschaltet wurde, und Zellen, bei denen sowohl DNA Ligase IV als auch Artemis ausgeschaltet wurden. Auf Abbildung 3.13. auf Seite 57 sind die Ergebnisse der DNA-Reparaturexperimente dieser drei Knockout-Mutanten abgebildet. Die Diagramme der Durchflusszytometrie passen zu Zellen, die sich im Zustand des exponentiellen Wachstums befinden. Die Dosiswirkungskurven sind für die gemessenen Strahlendosen relativ linear.

Eine DNA Ligase IV Defizienz wirkt sich stark verlangsamen auf die Reparaturkinetik aus. Dabei ist vor allem die frühe, schnelle Komponente betroffen. Zum Zeitpunkt von 8 Stunden haben die entsprechenden Zellen weit weniger DSBs repariert als der Wildtyp. Nach Wortmanninzugabe ist die schnelle Komponente noch weiter eingeschränkt. Die Reparaturkinetik entspricht dann nahezu der des durch Wortmannin inhibierten Wildtyps, scheint aber tendenziell minimal langsamer zu sein. Eine Artemis-Defizienz wirkt sich ebenfalls auf die Reparaturkinetik aus. Während diese zunächst noch derjenigen des Wildtyps ähnelt, werden zu den späteren Zeitpunkten von 4 und 8 Stunden Unterschiede erkennbar. Die langsame Komponente erscheint langsamer und insgesamt werden ungefähr 10% weniger der ursprünglich vorhandenen DSBs repariert. Kommt eine DNA Ligase IV Defizienz dazu, so wirkt sich ihr starker Effekt bei den betroffenen Zellen auch deutlich aus und die schnelle Komponente nimmt an Geschwindigkeit ab. Der mildere Effekt der Artemis-Defizienz selbst, ist auch hier-

### 3. Ergebnisse

bei ersichtlich. So wird zu späten Zeitpunkten ein Unterschied der *LIG4*  $-/-$  *Artemis*  $-/-$  Zellen zur Reparaturkinetik der *LIG4*  $-/-$  Zellen erkennbar, ähnlich wie das beim *Artemis*  $-/-$  Mutanten im Vergleich zum Wildtyp der Fall ist.

Wird Wortmannin verabreicht, so nimmt die schnelle Komponente bei den *Artemis*-defizienten Zellen sehr deutlich an Geschwindigkeit ab – noch stärker als beim Wildtyp. Die *LIG4*  $-/-$  *Artemis*  $-/-$  Mutante repariert noch etwas langsamer und auch bei ihm hat die Wortmanninzugabe die schnelle Komponente beeinträchtigt. Zum 8 Stunden Zeitpunkt hat er etwas über ein Drittel der strahleninduzierten DSBs repariert. Die einzig DNA Ligase IV defiziente Mutante reparierte in diesem Zeitraum ca. die Hälfte seiner DSBs.

## 3.8. Reparaturkinetik *RAD54*-defizienter NALM

### Zellen

Um zu untersuchen, ob sich ein Defekt in der HR auf die Reparaturfähigkeit von DSBs auswirkt, wurde eine Knockout-Mutante mit *RAD54*-Defizienz benutzt. *RAD54* ist vielseitig an verschiedenen Schritten der HR beteiligt (siehe Abschnitt 1.3.3., Seite 18). Die Ergebnisse sind auf Abbildung 3.14. auf Seite 58 zu finden. Die Zellen befanden sich im exponentiellen Wachstum und dazu passt die Zellzyklusverteilung. Die Dosiswirkungskurve ist auch hier relativ linear.

Die Reparaturkinetik ist im Vergleich zum Wildtyp langsamer, was sich bereits kurz nach der Bestrahlung abzeichnet. Dennoch ist sie sehr effektiv. Beim 8 Stunden Zeitpunkt angelangt, haben die defizienten Zellen ähnlich viele DSBs wie der Wildtyp repariert. Aber die frühe, schnelle Komponente ist beeinträchtigt. Nach Zugabe von Wortmannin wird die Reparaturkinetik nochmals merklich langsamer, aber nur im Bereich bis 2 Stunden. Danach ist die Reparatur so schnell wie ohne DNA-PK-Inhibitor. Eine schnelle Komponente ist bei dieser Reparaturkinetik nicht mehr erkennbar. Stattdessen scheint die Reparatur über die gemessene Zeitdauer mit einer relativ gleichmä-

### 3. Ergebnisse

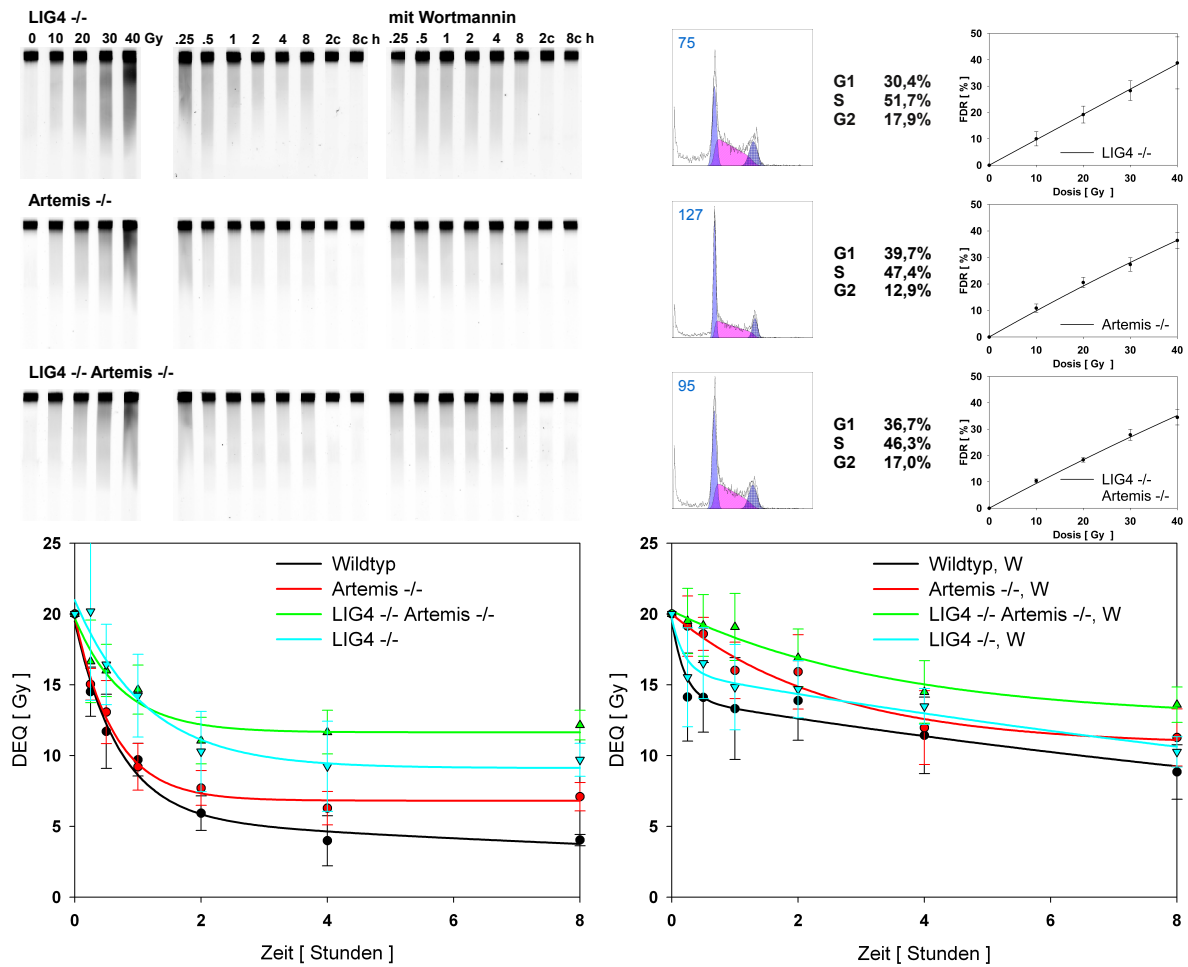


Abbildung 3.13.: **Reparaturkinetik röntgenstrahleninduzierter DSBs bei DNA Ligase IV und Artemis-defizienten NALM Zellen.** Oben links sind exemplarische Gelscans aus den DNA-Reparatur-experimenten abgebildet. Oben rechts sind Histogramme aus der Durchflusszytometrie mitsamt der mit dem Computerprogramm Multicycle bestimmten Zellzyklusverteilung zu sehen. Die Zellen für diese Messungen stammen jeweils vom Zeitpunkt zu Beginn des Experimentes, Zelldoubletten wurden herausgefiltert. Rechts der Histogramme sieht man Dosiswirkungskurven. Die Gelscans, das Histogramm und die Dosiswirkungskurve in einer Spalte gehören alle zur am Anfang der Spalte angegebenen Knockout-Mutante. Unten links ist die Reparaturkinetik ohne Wortmanninapplikation und unten rechts mit Wortmanninapplikation (20 µM) dargestellt. Die Daten des Wildtyps sind zum Vergleich ebenfalls aufgetragen. Die Strahlendosis betrug 20 Gy.

### 3. Ergebnisse

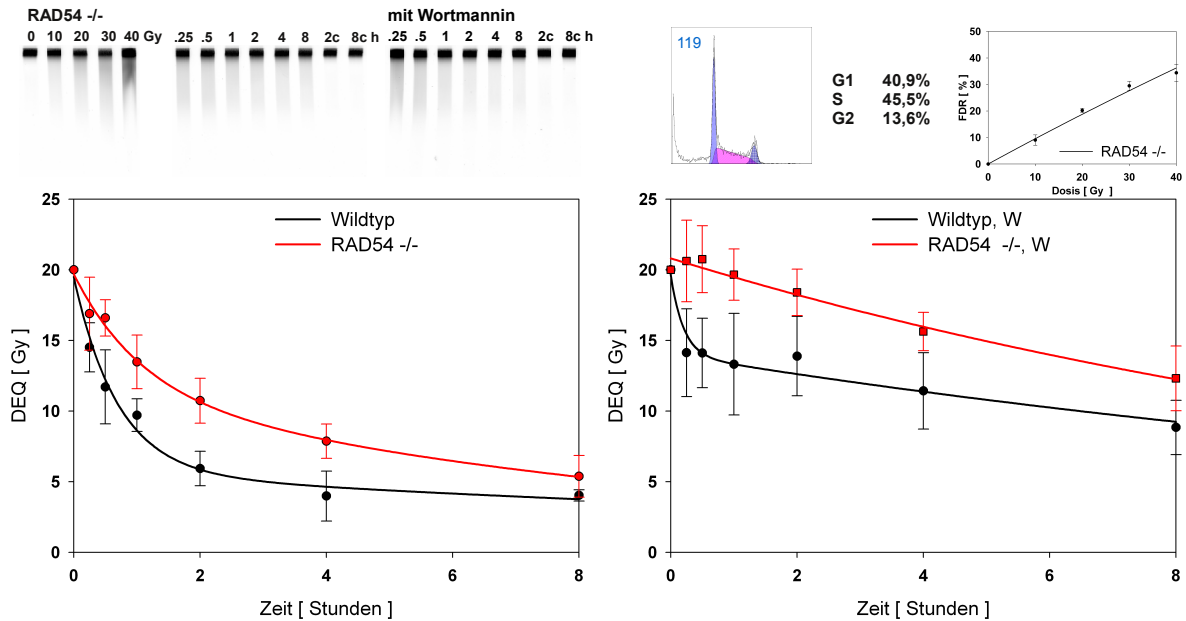


Abbildung 3.14.: **Reparaturkinetik röntgenstrahleninduzierter DSBs bei RAD54-defizienten NALM Zellen.** Für eine Beschreibung der Darstellung, siehe Abbildung 3.13., Seite 57.

ßen Geschwindigkeit zu erfolgen. In den 8 Stunden wurden über ein Drittel der DSBs repariert.

### 3.9. Reparaturkinetik gleichzeitig DNA Ligase IV und RAD54-defizienter NALM Zellen

Auf Abbildung 3.15. auf Seite 59 sieht man die Resultate von NALM Zellen, die DNA Ligase IV und RAD54-defizient sind, wodurch sowohl das NHEJ als auch die HR behindert werden. Auch hier gibt es eine zur exponentiellen Wachstumsphase passende Zellzyklusverteilung und eine relativ lineare Dosiswirkungskurve.

Man sieht eine deutliche Unterlegenheit gegenüber dem Wildtyp. Das trifft vor allem auf die frühe, schnelle Komponente zu, während die anschließende langsame Komponente kaum betroffen ist. Die Reparaturkinetik ist ähnlich zu der einer DNA Ligase IV Defizienz alleine. Wird Wortmannin appliziert, dann erinnert die Reparaturkinetik sehr an diejenige der mit Wortmannin behandelten RAD54 -/- Mutante: Die Repa-

### 3. Ergebnisse

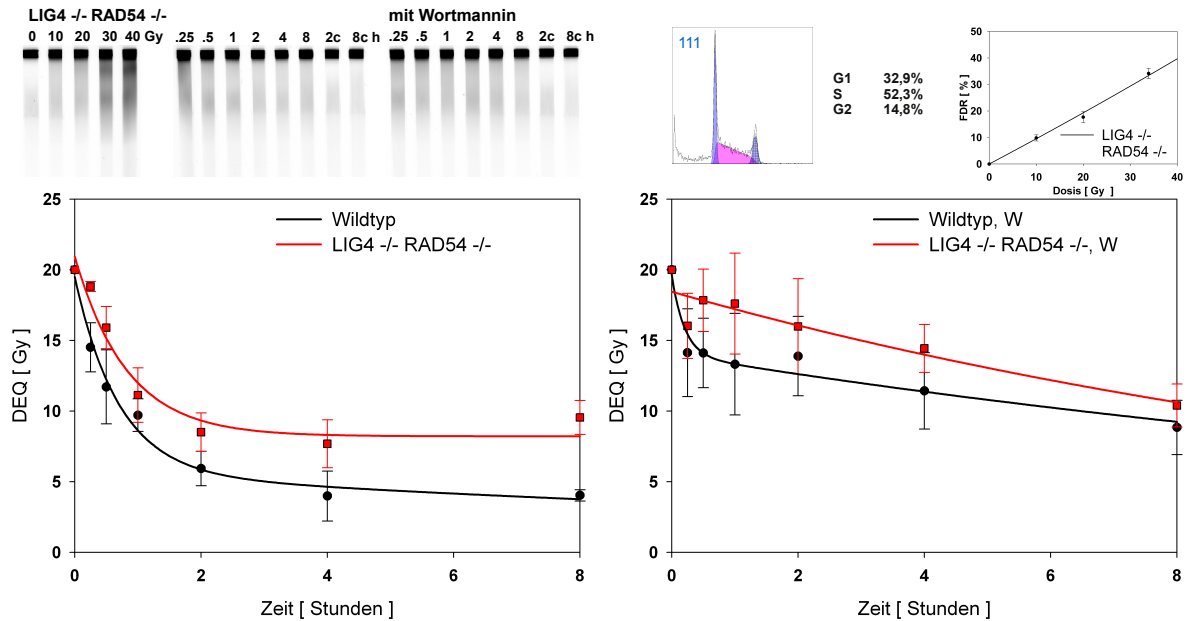


Abbildung 3.15.: **Reparaturkinetik röntgenstrahleninduzierter DSBs bei gleichzeitig DNA Ligase IV und RAD54-defizienten NALM Zellen.** Für eine Beschreibung der Darstellung, siehe Abbildung 3.13., Seite 57.

raturgeschwindigkeit erscheint relativ gleichmäßig und eine schnelle Komponente ist nicht ersichtlich. Die Werte des 15 Minuten Zeitpunktes weichen allerdings von den nachfolgenden etwas nach unten hin ab. Letztendlich werden während des gemessenen Zeitraumes aber kaum weniger DSBs repariert als beim DNA-PK-inhibierten Wildtyp.

### 3.10. Reparaturkinetik p53-defizienter NALM Zellen

Das vom TP53-Gen kodierte Protein p53 ist an vielen verschiedenen Mechanismen beteiligt. Dazu werden die Regulation von Metabolismus, Fruchtbarkeit, Differenzierung und Entwicklung gezählt. Es reguliert auch die Zellzyklusverzögerung und die Einleitung von Apoptose als Antwort auf Zellschaden [Vousden, Prives, 2009]. Beim Auftreten von DSBs wird p53 aktiviert und seine Konzentration in der Zelle erhöht [Jiang et al., 2010]. Die Zellzyklusverzögerung ermöglicht es der Zelle, zuerst ihre DNA-Schäden zu reparieren, bevor sie mit ihrer Proliferation fortfährt, was mögliche fatale Folgen für sie, ihre Tochterzellen und letztlich den Gesamtorganismus, verhindern kann.

### 3. Ergebnisse

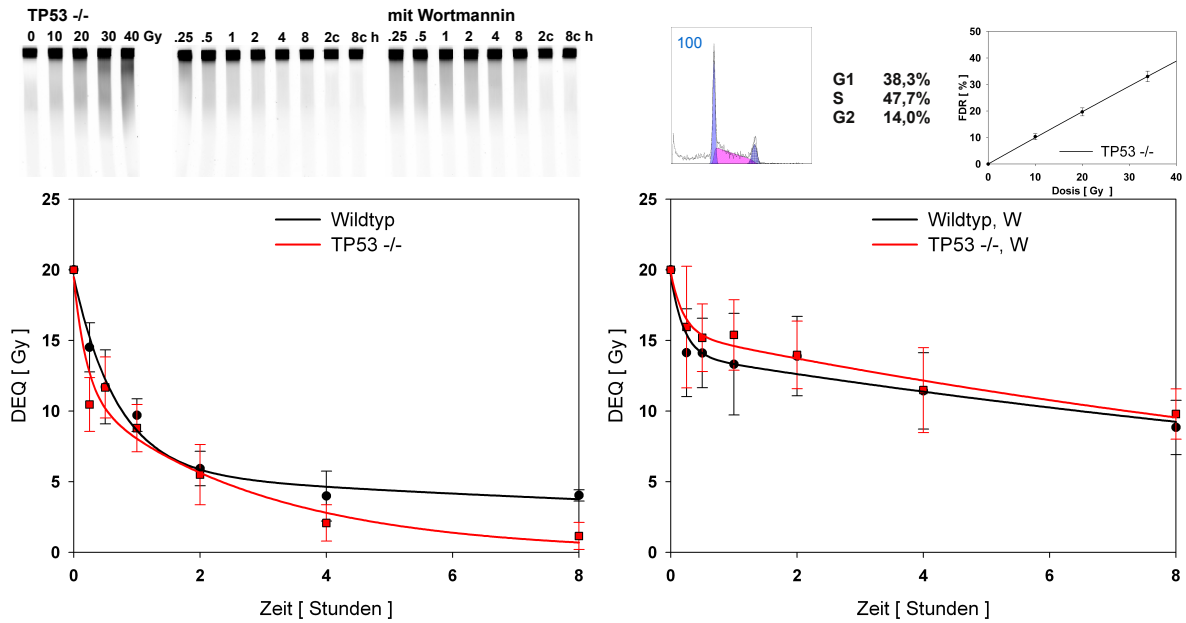


Abbildung 3.16.: **Reparaturkinetik röntgenstrahleninduzierter DSBs bei p53-defizienten NALM Zellen.** Für eine Beschreibung der Darstellung, siehe Abbildung 3.13., Seite 57.

Bei besonders schwerem Schaden kann die Seneszenz eingeleitet werden: Der Zellzyklus wird permanent arretiert, wodurch sich die betroffene Zelle nicht mehr teilen wird. Als weitere Option steht in solchen Fällen auch die Förderung der Apoptose zur Verfügung. Wegen diesen Funktionen ist p53 ein Tumorsuppressor [Vousden, Prives, 2009]. Eine p53-Defizienz wirkt sich stark karzinogen aus und in sehr vielen Tumoren ist TP53 mutiert. [Olivier et al., 2010].

Die Ergebnisse der Reparatorexperimente mit p53-defizienten Zellen sind auf Abbildung 3.16., Seite 60, dargestellt. Die Zellzyklusverteilung spiegelt auch hier das exponentielle Wachstum wider, die Dosiswirkungskurven sind relativ linear.

Die p53-defizienten Zellen reparieren zunächst weitgehend wie der Wildtyp. Ab dem 4 Stunden Zeitpunkt setzen sie sich aber etwas vom Wildtyp ab und schaffen es in den 8 Stunden des Messzeitraumes, nahezu alle DSBs zu reparieren. Nach Zugabe von Wortmannin gleicht die Reparaturkinetik der Mutante der des mit Wortmannin inhibierten Wildtyps.



## 4. Diskussion

### 4.1. Hintergrund

DNA-Doppelstrangbrüche sind gefährliche Schäden, die den Zelltod oder Mutationen verursachen können. Zellen haben umfangreiche Reparaturmechanismen entwickelt, um diese Schäden zu beheben. Zu diesen gehören das NHEJ, das B-NHEJ und die HR. Die diesen Reparaturmechanismen zugrunde liegenden molekularen Grundlagen wurden in der Einleitung beschrieben. Die DSB-Reparatur innerhalb von Zellen lässt sich mit unterschiedlichen Methoden quantifizieren, wobei alle Methoden ihre Limitierungen haben.

Physikalische Methoden wie die der Konstantfeld-, Pulsfeld- und Einzelzell-Gelelektrophorese messen DSB-induzierte Änderungen der DNA-Größe. Liegen viele DSBs vor, so sind viele kleinere DNA-Fragmente vorhanden. Werden die DSBs mit der Zeit repariert, so werden die kleineren Fragmente zusammengefügt und es entstehen größere Fragmente. Da die Fragmente abhängig von ihrer Größe in der Gelelektrophorese bewegt werden, lässt sich diese Eigenschaft dazu nutzen, auf die Menge der vorhandenen DSBs zu schließen [Stamato, Denko, 1990]. Solche Methoden benötigen hohe Strahlendosen von über 5 Gy [Kinner et al., 2008].

Eine neuere, in heutiger Zeit häufig benutzte biochemische Methode, um DSB-Reparatur zu quantifizieren, ist die der  $\gamma$ -H2AX Fokusformation. Bei der  $\gamma$ -H2AX Fokusformation macht man sich zunutze, dass das Auftreten von DSBs mit einer Phosphorylierung von Histon H2AX auf Serin 139 einhergeht und so Histon  $\gamma$ -H2AX ent-

#### 4. Diskussion

steht, was man unter Verwendung gegen  $\gamma$ -H2AX gerichteter Antikörper fluoreszenzmikroskopisch messen kann. Hierbei kann man kleinere Strahlendosen von deutlich unter 5 Gy einsetzen, wie sie therapeutisch relevanter sind. Die Methode zeigt aber nicht, ob ein DSB tatsächlich repariert wurde, sondern zeigt zelluläre metabolische Aktivitäten, welche die DSB-Reparatur unterstützen und optimieren. Da die Fokusformation zudem durch komplexe biochemische Interaktionen vieler Proteine zustande kommt, auch solcher, die nicht an der Reparatur beteiligt sind, können einerseits Foci entstehen, ohne dass sich an deren Stelle ein DSB befindet, andererseits können DSBs repariert werden, ohne dass an deren Position Foci entstehen [Kinner et al., 2008]. Sowohl die physikalischen Methoden als auch die Methode der  $\gamma$ -H2AX Fokusformation geben keine Auskunft darüber, mit welcher Genauigkeit repariert wurde. Für diese Methoden macht es keinen Unterschied, ob sich die Sequenz geändert hat, oder ob genau die Enden miteinander verbunden wurden, welche ursprünglich zusammengehörten, oder nicht.

Die mit der  $\gamma$ -H2AX Fokusformation und der Pulsfeldgelelektrophorese gemessenen Reparaturkinetiken unterscheiden sich voneinander [Kinner et al., 2008]. Dennoch zeigt die mit beiden Methoden gemessene Reparaturkinetik menschlicher Zellen einen biphasischen Verlauf, welcher in eine schnelle und eine langsame Komponente unterteilt werden kann. Die schnelle Komponente arbeitet mit einer Halbwertszeit von einigen Minuten und entfernt über 60–80% der DSBs. Die langsame Komponente wiederum arbeitet mit einer Halbwertszeit von einigen Stunden und entfernt die restlichen [DiBiase et al., 2000, Kinner et al., 2008]. Während die schnelle Komponente dem NHEJ zugeschrieben wird, wird die langsame Komponente der HR und/oder dem B-NHEJ zugeschrieben [Wang et al., 2001b, Wu et al., 2008a]. Über das Untersuchen von Zellen mit bekannten Mutationen, das Ausschalten eines oder mehrerer Proteine von DNA-Reparaturmechanismen, oder deren Inhibition, wird versucht, anhand der resultierenden Reparaturkinetik Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Proteine und auf den Anteil der verschiedenen Reparaturmechanismen an der Reparaturkinetik des Wildtyps zu schließen.

#### 4. Diskussion

Wenn man auf Zellen zurückgreift, die auf natürliche Weise mutiert sind (z.B. Anlegen einer Zellkultur aus einer erkrankten Person), dann trifft man auf das Problem, dass die unterschiedlichen Mutanten sich nicht nur hinsichtlich der Mutation, sondern weit darüber hinaus unterscheiden können. Im Vergleich dazu hat das genetische Ausschalten von Proteinen in einer einzelnen Zelllinie den Vorteil, dass die so entstehenden Mutanten untereinander besser vergleichbar sind, als wenn man Mutanten aus verschiedenen Gewebearten, Krebsarten oder Individuen vergleichen würde.

Zum Erstellen einer Knockout-Mutante durch gezielte Genmodifikation, wird DNA in das Genom einer Zelle integriert. Da das Verhältnis zwischen gezielten Integrationen am erwünschten Zielort im Vergleich zu zufälligen Integrationen in menschlichen Zellen vergleichsweise gering ist, waren Knockout-Mutanten menschlicher Zellen zunächst relativ selten [Adachi et al., 2008]. Doch gab es umfangreiche Untersuchungen mit Knockouts anderer, geeigneterer Spezies wie Mäusen, Hamstern und Hühnern [Wu et al., 2008a, Wu et al., 2008b, Wang et al., 2001b]. Mit der Zeit haben sich die Möglichkeiten der gezielten Genmodifikation menschlicher Zellen verbessert. NALM-6 ist eine maligne menschliche Pre-B Zelllinie mit der seltenen Eigenschaft, dass mit ihr eine gezielte Genmodifikation effizient durchgeführt werden kann [Adachi et al., 2008]. Deswegen stehen seit Kurzem eine Reihe von Knockout-Mutanten dieser Zelllinie zur Verfügung. Für sie spricht auch, dass sie vergleichsweise wenig von gesunden Zellen abzuweichen scheint, indem sie einen nahezu stabilen diploiden Karyotyp und einen normalen p53 Status aufweist [Wlodarska et al., 1997, Filippini et al., 1998].

Viele Erkenntnisse im Bereich der DNA-Reparatur basieren auf Experimenten mit nichtmenschlichen Zellen. Obgleich Menschen mit Tieren, wie Mäusen und Hühnern, gewisse Ähnlichkeiten haben, sind sie offensichtlich doch unterschiedlich. Was bei Hühnerzellen zutrifft, muss bei menschlichen Zellen nicht zutreffen. Es ist deswegen erstrebenswert, wenn es möglich ist, Erkenntnisse an menschlichen Zellen selbst zu gewinnen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dieses Problem anzugehen und zu überprü-

#### 4. Diskussion

fen, ob Experimente mit den menschlichen NALM Zellen die Erkenntnisse aus Experimenten mit Zellen anderer Tiere bestätigen können. Es werden dabei durchgängig Knockout-Mutanten derselben Zelllinie verwendet. Darunter sind Mutanten, deren Reparaturkinetik aus anderen menschlichen Zelllinien bekannt ist, und Mutanten, deren Reparaturkinetik nur in nichtmenschlichen Zellen gemessen wurde. Als weiterer Schritt werden Knockout-Mutanten verwendet, deren Reparaturkinetik sowohl beim Menschen als auch in anderen Tieren noch nicht bekannt ist.

Diese Ziele der vorliegenden Studie lassen sich wie folgt unterteilen:

1. Entwicklung eines Testsystems, in dem die Reparaturkinetik der NALM Zellen über einen genügend langen Zeitraum (8 Stunden) gemessen werden kann.
2. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen ein für das NHEJ wichtiges Protein nicht zur Verfügung steht (DNA Ligase IV).
3. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen ein für die HR wahrscheinlich wichtiges Protein nicht zur Verfügung steht (RAD54).
4. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen sowohl ein für das NHEJ wichtiges als auch ein für die HR wahrscheinlich wichtiges Protein nicht zur Verfügung stehen (DNA Ligase IV und RAD54).
5. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen ein DSB-Enden-modifizierendes Protein nicht zur Verfügung steht (Artemis).
6. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen sowohl ein DSB-Enden-modifizierendes Protein als auch ein wichtiges Protein eines Reparaturmechanismus fehlen, in dem das modifizierende Protein gesichert involviert ist (Artemis und DNA Ligase IV).

## 4. Diskussion

7. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei Zellen, in denen das Protein p53 nicht zur Verfügung steht, welches bei maligne entarteten Zellen sehr häufig mutiert ist und dessen Fehlen sich stark karzinogen auswirkt.
8. Messung und Beurteilung der Änderungen der Reparaturkinetik bei allen diesen Zellen, wenn DNA-PK chemisch inhibiert wird.
9. Analyse der Resultate im Hinblick auf die Anteile einzelner Reparaturmechanismen an der Reparaturkinetik.
10. Vergleich der Resultate mit Daten, die mit anderen Zelllinien gewonnen wurden.

## 4.2. Entwicklung eines Testsystems zur Messung der Reparaturkinetik von NALM Zellen

### 4.2.1. Wachstumsverhalten von NALM Zellen

Als ersten Schritt galt es, ein Testsystem zu entwickeln, in dem die Reparaturkinetik der NALM Zellen über einen genügend langen Zeitraum (8 Stunden) gemessen werden kann. Dazu gehörte es zunächst, die Wachstumsbedingungen zu optimieren und zu standardisieren, so dass die ersten Experimente das Wachstumsverhalten untersuchten. Dazu wurden Wachstumskurven erstellt und mit der Durchflusszytometrie kombiniert.

Es wurde geprüft, welches Medium gut von den NALM Zellen getragen wird, ob sich das Wachstumsverhalten der verschiedenen NALM Varianten voneinander unterscheidet und mit welchen Zellmengen die Zellen passagiert werden sollten. Damit wurde das Ziel verfolgt, genügend hohe Zellmengen für das Experiment zur Verfügung zu haben, ohne dass die Zellen durch Nährstoff- oder Platzmangel gestresst sind.

Es wurde festgestellt, dass die NALM Zellen in allen getesteten Medien gut wachsen, so dass alle drei dazu geeignet sind, NALM Zellen in ihnen zu halten (siehe Abbildung 3.1., Seite 40). Desweiteren wurde festgestellt, dass die verschiedenen NALM Mutanten

#### 4. Diskussion

ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen, so dass sie zu jedem Zeitpunkt identisch behandelt werden konnten, was die Vergleichbarkeit untereinander verbessert (siehe Abbildung 3.4., Seite 44).

Es gibt Zelllinien, welche bei Platz- und/oder Nährstoffmangel mit einer Verringerung der Proliferation reagieren. Ihr zunächst exponentielles Wachstum geht in eine Plateauphase über, in der sich die Zellkonzentration nur wenig ändert. Die Wachstumskurven der NALM Zellen sehen auch so aus: Die gemessenen Zellkonzentrationen sprechen für ein zunächst exponentielles Wachstum, welches dann allmählich nachlässt und in ein Plateau übergeht. Die Durchflusszytogramme zeigen auch, wie der Anteil an Zellen in der G2 Phase abnimmt und der Anteil an Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus zunimmt, was bedeutet, dass die Zellen durchaus ihr Wachstum einschränken, indem sie sich seltener teilen. Man sieht aber auch, dass zunehmend Partikel gemessen werden, in denen weniger DNA-Gehalt angezeigt wird, als eine Zelle in der G1 Phase hätte. Das lässt die Vermutung aufkommen, dass möglicherweise zunehmend mehr Zellen abgestorben sind. Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen die Apoptose eingeleitet haben. Wie bereits erwähnt, werden bei der Pulsfeldgelelektrophorese Änderungen der DNA-Größe gemessen. Wenn Zellen in Apoptose gehen, fragmentieren sie ihre DNA, ändern also ihre DNA-Größe [Nagata et al., 2003]. Sollte der Anteil apoptotischer Zellen zu groß werden, dann würde sich das stark auf die Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese auswirken und die Reparaturkinetik verfälschen.

#### 4.2.2. Frühes Aufkommen apoptotischer Zellen in NALM

##### Zellkulturen

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mikroskopisch quantifiziert. Auf Abbildung 3.8., Seite 50, sieht man, dass der NALM Wildtyp, selbst ohne Bestrahlung oder Zugabe von Inhibitoren (aber einer kleinen Menge sterilen DMSOs), 24 Stunden nach Beginn des Experimentes bereits einen stark erhöhten Anteil apoptotischer Zellen hat. Einen weiteren Tag später beträgt der Anteil apoptotischer Zellen sogar ungefähr 70%. Die

#### 4. Diskussion

entsprechende Wachstumskurve (Abbildung 3.5., Seite 45, 0.13 M/ml) deutet bis Tag 4 (dem Äquivalent zum 24 Stunden Zeitpunkt bei der Apoptosequantifizierung) weiterhin exponentielles Wachstum und bei Tag 5 erst eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit an. Wenn man diese Ergebnisse zusammenführt, kann man darauf schließen, dass die NALM Zellen schon früher Wachstumsprobleme haben, als die Wachstumskurven vermuten lassen würden. Vermutlich Nährstoffmangel lässt sie schon sehr früh absterben und eine Plateauphase, in der Zellen ihr Wachstum eingeschränkt, aber keinen Schaden genommen haben, ist wahrscheinlich nicht vorhanden. Was die Wachstumskurven in späteren Zeitpunkten messen, sieht zwar aus wie ein sanfter Übergang in eine Plateauphase, es handelt sich aber eher um eine Ansammlung vorwiegend abgestorbener Zellen, während der geringere Anteil der überlebenden Zellen durch eine Proliferation weiterhin zu einem langsamen Anstieg der Zellkonzentration beiträgt. Da es sich um eine Suspensionszelllinie handelt, werden alle nicht zerfallenen Zellen bei der Konzentrationsbestimmung gemessen, unabhängig davon, ob sie noch leben oder nicht.

Wie sich der hohe Anteil apoptotischer Zellen auf die Pulsfeldgelelektrophorese auswirkt, sieht man auf Abbildung 3.7. auf Seite 48. Die Zellen wuchsen nach ihrer Passage 5 Tage lang, weshalb anzunehmen ist, dass der Anteil apoptotischer Zellen bereits zu Beginn des Experimentes ca. 70% betrug. Die erhobenen Messwerte einzelner Blöcke eines Messpunktes wichen stark voneinander ab.

Um der Problematik eines hohen Anteils apoptotischer Zellen auszuweichen, wurden zur Bestimmung der Reparaturkinetik sicher exponentiell wachsende Zellen eingesetzt, die zeitlich noch weit von einem Nachlassen des exponentiellen Wachstums laut Wachstumskurve und Durchflusszytometrie entfernt waren, und darauf geachtet, dass die Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Konzentration von 2 M/ml erreichten. Dieses wurde erreicht, indem ca. alle 72 Stunden mit einer initialen Zellkonzentration von 0,13 M/ml passagiert wurde und auch die Zellen, bei denen die Reparaturkinetik bestimmt wurde, seit ihrer Passage bis zum entsprechenden Experiment fast drei Tage lang wuchsen.

### 4.2.3. Empfindlichkeit von NALM Zellen gegenüber

#### Röntgenstrahlung oder Applikation von Wortmannin

Zellen können auch auf Bestrahlung mit Apoptose reagieren, was in der Pulsfeldgelelektrophorese eine schlechtere Reparaturfähigkeit suggerieren würde, als tatsächlich der Fall ist. Ein Vorexperiment mit dem NALM Wildtyp zeigte, dass ab 4 Stunden nach Bestrahlung ein überaus großer Anteil der Proben ins Gel migrierte, was bedeutet, dass in den Proben der Anteil kleinerer DNA-Fragmente stark zugenommen haben muss (Abbildung 3.6., Seite 47). Das deutet auf eine Fraktionierung der DNA im Rahmen von Apoptose hin [Nagata et al., 2003]. Im selben Experiment gab es eine Messreihe mit den selben NALM Zellen, die aber mit Caspase Inhibitor III behandelt wurden. Dabei handelt es sich um den Breitspektrum Caspase Inhibitor tert-butoxycarbonyl-Asp-(O-methyl)-fluoromethylketon (Boc-Asp-FMK bzw. Boc-D-FMK), mit welchem Apoptose zu einem Zeitpunkt vor der DNA-Fragmentierung gehemmt werden kann [D’Mello et al., 1998, Wyllie, 2010]. In dieser Messreihe blieben alle Proben unauffällig, was die Vermutung, die sehr ausgeprägte Migration der Proben späterer Zeitpunkte ins Gel könnte an Apoptose liegen, bekräftigt.

Es kann aber sein, dass sich in den unauffällig aussehenden Proben mit Caspase Inhibitor III der Anteil apoptotischer Zellen über die Zeit verändert hat, ohne dass es auf dem Gel offensichtliche Hinweise darauf gibt. Das könnte daran liegen, dass die Änderung des Anteils apoptotischer Zellen sich in einem Größenbereich bewegt hat, der nicht groß genug dafür wäre, auf dem Gel aufzufallen. Sollte es sich um Apoptose handeln, könnte es auch sein, dass die Zugabe des Caspase Inhibitors III diese nur zeitlich verschoben hat. Sollte diese Zeitspanne gering sein, dann wäre es möglich, dass die Zellen zu den späteren Messzeitpunkten kurz davor waren, apoptotisch zu werden, was sich bereits auf ihre Fähigkeit zur DNA-Reparatur ausgewirkt haben könnte.

Um zu überprüfen, ob es sich um Apoptose handelt, und um diese Fragen zu beantworten, wurden Experimente durchgeführt, um den Anteil apoptotischer Zellen während der DNA-Reparaturexperimente zu quantifizieren. Außer der Bestrahlung wurde



#### 4. Diskussion

auch der Effekt von Wortmannin auf den Anteil apoptotischer Zellen getestet, da dieses bei den DNA-Reparaturexperimenten Verwendung findet. Dabei hat man sich zunutze gemacht, dass Zellkernfragmentierung und Chromatinkondensation infolge von Apoptose mikroskopisch sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 2.3., Seite 37).

Es stellte sich heraus, dass der Anteil apoptotischer Zellen während des Experimentes massiv zunimmt, wenn diese bestrahlt wurden, bis es nur noch wenige Zellen gibt, die nicht in Apoptose gegangen sind (siehe Abbildung 3.8., Seite 50). Auch die Zugabe von Wortmannin resultiert in einem sehr großen Anteil apoptotischer Zellen, wobei dieser Effekt nicht so stark wie bei der Bestrahlung ist. Werden die Zellen weder bestrahlt, noch mit Wortmannin behandelt, so bleibt der Anteil apoptotischer Zellen während der Dauer eines DNA-Reparaturexperimentes von 8 Stunden auf einem konstanten niedrigen Niveau. Dennoch nimmt der Anteil apoptotischer Zellen zum 24 Stunden Zeitpunkt deutlich und zum 48 Stunden Zeitpunkt kräftig zu. Wie bereits erwähnt, wird das auf einen Nährstoffmangel zurückgeführt. Wurden die Zellen aber mit Caspase Inhibitor III behandelt, blieb der gemessene Anteil apoptotischer Zellen selbst bis 48 Stunden nach Beginn des Experimentes auf einem konstanten niedrigen Niveau, unabhängig von Bestrahlung, Wortmanningabe oder einer langen Verweildauer in Kultur. Allerdings ist es möglich, dass hierbei Zellen abgestorben sind, ohne morphologische Hinweise auf Apoptose zu geben [Chipuk, Green, 2005, Wyllie, 2010]. Dass der Anteil apoptotischer Zellen während eines DNA-Reparaturexperimentes unter Verwendung von Caspase Inhibitor III unverändert auf einem niedrigen Niveau bleibt, trifft auf den Wildtyp und alle verwendeten NALM Knockout-Mutanten zu (siehe Abbildung 3.11., Seite 52).

Die Migration eines überaus großen Anteils der Proben nicht mit Caspase Inhibitor III inhibierter Zellen ins Gel lässt sich tatsächlich auf Apoptose zurückführen. Desweiteren ändert sich der Anteil an Zellen mit morphologischen Hinweisen auf Apoptose während eines DNA-Reparaturexperimentes und noch Tage nach diesem nicht, wenn die Zellen mit Caspase Inhibitor III behandelt wurden, weshalb unter diesen Bedingungen ein Einfluss von apoptotischer DNA-Fraktionierung auf die gemessene Repa-

raturkinetik nicht zu erwarten ist. Zusammenfassend bedeutet das, dass die Messung der Reparaturkinetik durch die Zugabe des Apoptose inhibierenden Caspase Inhibitors III überhaupt erst möglich wird und auch Wortmannin bei diesen Messungen verwendet werden kann. Entsprechend war die Gabe von Caspase Inhibitor III ein wichtiger, notwendiger Schritt in den DNA-Reparaturexperimenten.

### 4.3. DNA Ligase IV Defizienz und DNA-PK-Inhibition

Frühere Untersuchungen haben eine kritische Rolle für DNA Ligase IV im NHEJ aufgezeigt. Sie ist für das NHEJ essentiell und menschliche Zellen mit DNA Ligase IV Defizienz haben eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlung, was auch Überlebenskurven der entsprechenden NALM Zellen zeigen [Grawunder et al., 1998]. Messungen der Reparaturkinetik mit der Technik der Pulsfeldgelelektrophorese in Mausembryofibroblasten (MEF) haben gezeigt, dass sich eine DNA Ligase IV Defizienz stark auf diese auswirkt [Windhofer et al., 2007]. Dabei wird die schnelle, frühe Komponente sehr beeinträchtigt. Eine starke Beeinträchtigung sieht man auch bei Defizienzen anderer wichtiger Komponenten des NHEJ, wie Untersuchungen mit DNA-PKcs-defizienten humanen malignen Gliomzellen [DiBiase et al., 2000], DNA-PKcs-defizienten MEFs [Wu et al., 2008a] und KU70-defizienten B-Lymphozyten des Huhns [Wang et al., 2001b] demonstrieren. Das trifft auch auf NALM Zellen zu, wie die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente mit LIG4 -/- NALM Zellen zeigen (siehe Abbildung 3.13., Seite 57). Und darüber hinaus ist dies auf jede Variante der NALM Zelllinie zutreffend, wenn DNA-PK mit Wortmannin inhibiert wurde (siehe beispielsweise Abbildung 3.12., Seite 54).

Die Synapse von DNA-PK-besetzten DNA-Enden aktiviert die Kinase-Aktivität von DNA-PK [DeFazio et al., 2002]. DNA-PK phosphoryliert eine sehr große Anzahl verschiedener Proteine. Darunter sind Proteine des NHEJs, aber beispielsweise auch Pro-

#### 4. Diskussion

teine, die zum B-NHEJ gezählt werden, und Proteine, die DNA-Schäden signalisieren. Es ist jedoch für die meisten Proteine unklar, welche Bedeutung diese Phosphorylierungen *in vivo* haben [Collis et al., 2005]. Steht DNA-PKcs nicht zur Verfügung, so nimmt der Anteil durch das NHEJ reparierter DSBs ab und der Anteil durch die HR reparierter DSBs zu. Anders sieht es aus, wenn DNA-PKcs zwar zur Verfügung steht, aber die Kinase-Aktivität beispielsweise durch Wortmannin inhibiert ist. In so einem Fall werden sowohl das NHEJ als auch die HR behindert [Allen et al., 2003]. Im Normalfall führt das Besetzen von DNA-Termini durch DNA-PK zur Reparatur der DSBs durch das NHEJ, an dem DNA-PK selbst mechanisch beteiligt ist, wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.1., Seite 7). Dazu gehört, dass die DNA-Enden durch Konformationsänderungen, verursacht durch die Autophosphorylierung von DNA-PK, für andere Proteine zugänglich gemacht werden [Hammel et al., 2010]. Ist die Kinase-Aktivität gestört, so sind auch diese Konformationsänderungen gestört. Die Blockade der DNA-Termini behindert dann sowohl das NHEJ als auch die HR [Allen et al., 2003] und kann theoretisch auch andere Reparaturmechanismen wie das B-NHEJ behindern, da deren Proteine auch Zugang zu den Enden brauchen. Zusätzlich sind auch die Phosphorylierungen der vielen Zielproteine von DNA-PK gestört. Wegen dieser umfangreichen Wirkung einer DNA-PK-Inhibition, erwartet man bei dieser eine stärkere Wirkung auf die Reparaturkinetik als bei einer DNA Ligase IV Defizienz, welche im Vergleich dazu nur den Endpunkt DNA Ligase IV abhängiger Reparaturmechanismen darstellt.

Der mit Wortmannin behandelte Wildtyp hat tatsächlich eine andere Reparaturkinetik als die DNA Ligase IV defiziente Knockout-Mutante. Der Anteil der schnellen Komponente ist zugunsten der langsamen Komponente verringert. Der Anteil der insgesamt über den Zeitraum von 8 Stunden reparierten DSBs ändert sich aber nicht. Ein leichter additiver Effekt von DNA Ligase IV Defizienz und Inhibition von DNA-PK lies sich beobachten, als LIG4 -/- Zellen mit Wortmannin behandelt wurden. Dabei wurde die Reparaturkinetik gleichzeitig der des mit Wortmannin behandelten Wildtyps

## 4. Diskussion

ähnlicher. Bei MEFs lies sich das in diesem Ausmaß nicht beobachten, dort wurden die Reparaturkinetiken von DNA Ligase IV defizienten Zellen mit und ohne Wortmanningabe als zu ähnlich interpretiert als dass man von einem Effekt sprechen könnte [Windhofer et al., 2007]. Möglicherweise spiegelt das aber einen Unterschied zwischen den Spezies wider, da menschliche Zellen im Vergleich zu Maus- oder Hamsterzellen die ungefähr fünfzigfache Menge an DNA-PK enthalten, was sich hier ausgewirkt haben könnte [Finnie et al., 1995]. Der Effekt, dass bei DNA-PK-Inhibition die schnelle Komponente der Reparaturkinetik zugunsten der langsamen weiter abnimmt, ist deutlicher zu sehen, wenn zusätzlich zur DNA Ligase IV Defizienz noch entweder eine Artemis- oder eine RAD54-Defizienz vorliegen (vgl. Abbildung 3.13., Seite 57, und Abbildung 3.15., Seite 59). Bis zu 4 Stunden nach Bestrahlung ist der Anteil nichtreparierter DSBs dann weithaus höher, bevor die Unterschiede 8 Stunden nach Bestrahlung gering sind.

Welchen Anteil die einzelnen sich aus der DNA-PK-Inhibition heraus ergebenden Störungen an diesem Effekt haben, kann anhand dieser Experimente nicht differenziert werden. Es wird die Aufgabe zukünftiger Experimente sein, dieses abzuklären.

### 4.4. Artemis-Defizienz

Eine Artemis-Defizienz wirkte sich ebenfalls auf die Reparaturkinetik aus. Dabei wurden im Messzeitraum ca. 10% weniger DSBs repariert. Dieses ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren, die eine Abnahme der Effizienz der Reparatur röntgenstrahleninduzierter DSBs um 10% [Riballo et al., 2004] oder 15–20% [Darroudi et al., 2007] in humanen Fibroblasten gemessen haben. Wie stark der Einfluss einer Artemis-Defizienz auf die Reparaturkinetik ist, hängt davon ab, womit die DSBs verursacht wurden. Er ist bei Bestrahlung mit Alpha-Strahlung größer als bei Röntgenstrahlung und bei Verwendung von Topoisomerase II Inhibitoren kleiner. Der Einfluss scheint deshalb größer zu sein, je komplexer die Läsionen sind, was zur Funktion von Artemis – dem Modifizieren von DNA-Enden – passt

#### 4. Diskussion

[Riballo et al., 2004, Darroudi et al., 2007].

Bei einer kombinierten Artemis- und DNA Ligase IV Defizienz zeigte sich eine schlechtere Reparaturkinetik als bei DNA Ligase IV Defizienz alleine. Das ist auch dann zu beobachten, wenn beide Mutanten mit Wortmannin behandelt wurden. Artemis wird vor allem zum NHEJ gerechnet, wie es in der Einleitung beschrieben wurde. Desweiteren sprechen Daten dafür, dass Artemis noch in einem anderen NHEJ-Pfad beteiligt ist, welcher vom Protein ataxia teleangiectasia mutated (ATM) und Artemis selbst abhängig ist und DNA Ligase IV verwendet [Riballo et al., 2004, Iwabuchi et al., 2006, Darroudi et al., 2007]. Wenn DNA Ligase IV nicht zur Verfügung steht, ist davon auszugehen, dass diese beiden Pfade ausgeschaltet wurden. Man würde dann auch nicht erwarten, dass eine Artemis-Defizienz einen zusätzlichen Effekt zu einer DNA Ligase IV Defizienz beitragen würde, sollte Artemis nur an diesen Signalwegen beteiligt sein.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass sich Artemis auch an der HR beteiligt. Dabei wurde unter anderem beobachtet, dass sich nach Bestrahlung Artemis-defizienter Zellen weniger Einzelstrang-DNA, weniger RPA Foci und weniger RAD51 Foci bilden, was sehr frühe Schritte der HR sind (siehe Abschnitt 1.3.1., Seite 15). Desweiteren konnte der Reparaturdefekt durch Artemis-Defizienz zwar durch Artemis-Gabe, aber nicht mit einem Endonuklease-defekten Artemis kompensiert werden, was darauf hinweist, dass Artemis die HR durch seine Nukleasefunktion unterstützt. Das ist Evidenz dafür, dass Artemis die frühen Schritte der HR als Nuklease fördert, potentiell während des Endmodifikationsschrittes, welcher notwendig für die Resektion strahleninduzierter DSBs ist. Ein wahrscheinliches Modell ist, dass Artemis Läsionen oder sekundäre Strukturen entfernt, welche ansonsten die Resektion inhibieren könnten [Beucher et al., 2009].

Die HR profitiert hiernach, so wie das NHEJ auch davon, dass Artemis DNA-Enden, die aufgrund ihrer Schäden nicht unmittelbar weiter bearbeitet werden können, entfernen kann, um sie weiteren Reparaturschritten zugänglich zu machen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, katalysieren alle DNA Ligasen das Ausbilden einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat und einer 3'-Hydroxygruppe

#### 4. Diskussion

[Ellenberger, Tomkinson, 2008]. Das trifft folglich auch auf die DNA Ligase III zu, von der angenommen wird, dass sie am B-NHEJ beteiligt ist [Audebert et al., 2004, Wang et al., 2005]. Diese dürfte entsprechend auch auf die Modifikation der Enden angewiesen sein, wenn diese Voraussetzung nicht gegeben ist. Es ist denkbar, dass auch in diesem Fall Artemis diese Modifikation durchführen kann. Eine Artemis-Defizienz würde dann zu einer Abnahme der Effizienz des B-NHEJs führen, abhängig davon, wie groß der Anteil komplexer Läsionen ist.

Zusammenfassend bedeutet das, dass der additive Effekt der Artemis-Defizienz vor dem Hintergrund einer DNA Ligase IV Defizienz oder einer DNA-PK-Inhibition auf eine dadurch verursachte Abnahme der Effizienz der HR oder des B-NHEJs oder beidem zurückzuführen sein könnte.

### 4.5. RAD54-Defizienz

Untersuchungen mit der Methode der Pulsfeldgelelektrophorese an tierischen Knock-out-Mutanten an der HR beteiligter Proteine haben gezeigt, dass diese weitgehend die Reparaturkinetik des Wildtyps aufweisen. Bei B-Lymphozyten des Huhns trifft das auf RAD51-, RAD51B-, RAD52- und RAD54-Defizienz, bei Zellen aus Ovarien eines chinesischen Hamsters auf XRCC2- und XRCC4-Defizienz, Paralogen von RAD51, und bei MEFs auf RAD54-Defizienz zu [Wang et al., 2001b, Wu et al., 2008a, Wu et al., 2008b]. Desweiteren wurde gezeigt, dass RAD54  $-/-$  LIG4  $-/-$  und LIG4  $-/-$  MEFs mit gleichwertiger Effizienz reparieren [Wu et al., 2008a].

Untersuchungen mit der Methode der  $\gamma$ -H2AX Fokusformation haben bei RAD54-defizienten MEFs aber eine schlechtere Reparatur in der G2 Phase des Zellzyklus gezeigt [Beucher et al., 2009]. Außerdem führt eine RAD54-Defizienz in Mausembryostammzellen zu einer erhöhten Strahlensensitivität und einer schlechter funktionierenden HR und bei MEFs einem schlechteren Wachstum [Essers et al., 1997, Mills et al., 2004]. Der Einfluss einer RAD54-Defizienz bei MEFs wird deutlich, wenn gleichzeitig DNA

#### 4. Diskussion

Ligase IV fehlt. Das Wachstum wird dann viel schlechter als bei einem Fehlen von DNA Ligase IV alleine und es gibt viel mehr spontan auftretende DSBs, während der Einfluss einer alleinigen RAD54-Defizienz dagegen vergleichsweise mild ausfällt [Mills et al., 2004].

Bei menschlichen Zervixkarzinomzellen wurde mit der Methode der  $\gamma$ -H2AX Fokussformation eine schlechtere Reparatur in der G2 Phase des Zellzyklus gezeigt, wenn diese RAD51- oder BRCA2-defizient sind [Beucher et al., 2009]. Mit der Pulsfeldgelelektrophorese konnte bei Zellen eines menschlichen Pankreaskarzinoms aber kein Einfluss einer BRCA2-Defizienz auf die Reparaturkinetik gezeigt werden [Wang et al., 2001b]. Wegen den unterschiedlichen Ergebnissen mit den beiden Methoden wurde spekuliert, dass die wesentlich höheren Dosen in der Pulsfeldgelelektrophorese mit ihrer daraus resultierenden hohen Menge an DSBs zu einer Sättigung der HR geführt haben könnten, so dass die überwältigende Mehrheit der DSBs über das NHEJ repariert wird und aufgrund dessen ein nur geringer Beitrag der HR in die Messung einfließt [Rothkamm et al., 2003].

Die bei RAD54-defizienten NALM Zellen gemessene Reparaturkinetik weicht von diesen Ergebnissen ab. Sowohl ohne als auch mit Wortmannin ist die Reparaturkinetik jeweils schlechter als die des Wildtyps (siehe Abbildung 3.14., Seite 58). Sind sowohl DNA Ligase IV als auch RAD54 ausgeschaltet, dann gleicht die Reparaturkinetik zunächst weitgehend der von nur DNA Ligase IV defizienten NALM Zellen. Wird aber Wortmannin appliziert, dann sieht sie der von DNA-PK-inhibierten RAD54-defizienten NALM Zellen sehr ähnlich (siehe Abbildung 3.15., Seite 59). Bei beiden scheint die Reparatur mit relativ gleichmäßiger langsamer Geschwindigkeit zu erfolgen und eine schnelle Komponente ist nicht auszumachen. Es ist also ein Effekt der Defizienz dieses HR-Proteins messbar. Und dieser Effekt kann bei gleichzeitiger Beeinträchtigung des NHEJs ebenfalls gemessen werden.

Möglicherweise sind diese Ergebnisse darauf zurückzuführen, dass RAD54 in den getesteten Hühner- oder Mauszellen eine andere Rolle spielt, als das bei humanen Zellen

der Fall ist. Bei den Hamsterzellen waren außerdem andere Proteine ausgeschaltet, was auch auf die anderen getesteten menschlichen Krebszellen zutrifft. Es ist auch möglich, dass das bei NALM Zellen bekannte hohe Leistungsniveau der HR [Adachi et al., 2006] zu diesen Ergebnissen geführt hat. Darüber hinaus kann es auch sein, dass die Eigenschaften der NALM Zellen als maligne Pre-B-Lymphozyten wegweisend sind. Weitere Nachforschungen in dieser Richtung sind notwendig, um dieses zu klären.

### 4.6. p53-Defizienz

Die p53-Defizienz hat in NALM Zellen zu einer leicht veränderten Reparaturkinetik geführt. Gegen Ende des Messzeitraumes sind bei dieser Knockout-Mutante im Vergleich zum Wildtyp weniger DSBs gemessen worden (siehe Abbildung 3.16., Seite 60).

Eine p53-Defizienz lässt Zellen nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung viel seltener in Apoptose gehen. Und Zellen, die nach 3 bis 4 Stunden nach Bestrahlung in Apoptose gehen, reparieren DSBs bis dahin vergleichbar zu Zellen, die nicht in Apoptose gehen [Griffiths et al., 1997]. Die NALM Zellen wurden mit Caspase Inhibitor III behandelt, um Apoptose zu verhindern, und der Anteil apoptotischer Zellen wurde quantifiziert. Unter diesen Bedingungen war der Anteil apoptotischer Zellen bei den p53-defizienten Mutanten während des gesamten Experimentes auf dem Niveau anderer Mutanten (vgl. Abbildung 3.11., Seite 52). Der Grund für die geringere Anzahl verbliebener DSBs bei p53-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp scheint demnach nicht auf eine seltenere Apoptose zurückführbar zu sein, obgleich sie sich passend erst ab 4 Stunden nach Bestrahlung vom Wildtyp absetzen.

Es gibt aber noch andere Arten programmierten Zelltodes als die Apoptose. Während Apoptose abhängig von Caspasen ist, gibt es auch Caspase-unabhängigen Zelltod, bei dem die DNA nicht fragmentiert wird. Werden Caspasen blockiert, dann kann diese Art von Zelltod anstatt der Apoptose eingeleitet werden [Chipuk, Green, 2005, Kroemer et al., 2009, Wyllie, 2010]. Solche Arten programmierten Zelltodes würden in



#### 4. Diskussion

der Pulsfeldgelelektrophorese aufgrund der fehlenden DNA-Fraktionierung nicht durch eine Zunahme der Migration von DNA aus der Probe in das Gel auffallen. Und auch die Zellkerne würden in der zur Apoptosequantifizierung eingesetzten Methode nicht auffallen, da eine Chromatinkondensation oder Zerteilung des Zellkernes meistens nicht stattfindet [Chipuk, Green, 2005]. Wenn ein Anteil der Zellen aber so abgestorben sein sollte, dann würden diese nicht zur Reparatur von verbliebenen DSBs beitragen, so dass die gemessene Reparaturkinetik langsamer werden würde. Die schlechtere DSB-Reparatur des NALM Wildtyps ließe sich dadurch erklären, dass bei diesem ein Anteil der Zellen so abgestorben ist, da p53 bei ihnen den Zelltod eingeleitet hat [Jiang et al., 2010], während die p53-defizienten Zellen davon nicht betroffen waren.

Dass die p53-Defizienz unter Blockade von DNA-PK keine Wirkung auf die Reparaturkinetik zeigt, könnte in so einem Fall daran liegen, dass DNA-PK daran beteiligt ist, die p53-Degradation zu verhindern [Boehme et al., 2008]. Die Verhinderung der Degradation führt normalerweise zu einer Akkumulation von p53, welche wiederum die bereits im Abschnitt 3.10., Seite 59, erwähnten Effekte auf die Zelle, inklusive Zelltodeinleitung zur Folge haben kann [Jiang et al., 2010, Vousden, Prives, 2009]. Ist DNA-PK blockiert, dann kann die Verhinderung der Degradation über diesen Mechanismus nicht mehr stattfinden, so dass möglicherweise nicht mehr genügend hohe p53-Konzentrationen erreicht werden, um den Zelltod einzuleiten. In diesem Falle würden sich die Reparaturkinetik p53-defizienter Zellen und des Wildtyps, in Abhängigkeit von Caspase-unabhängigem Zelltod, nicht voneinander unterscheiden. Übrig bliebe jeweils der Effekt einer DNA-PK-Inhibition auf DSB-Reparaturmechanismen.

Bei Mäusen wurde gezeigt, dass eine Deaktivierung von einem der drei Bestandteile von DNA-PK (KU70, KU80 oder DNA-PKcs) den Effekt der selteneren strahlenverursachten Apoptose durch p53-Defizienz größtenteils aufhebt [Gurley et al., 2009]. Sollte das auch beim Menschen zutreffen, wäre das ebenfalls eine mögliche Erklärung dafür, warum sich die Reparaturkinetiken unter Wortmanningabe gleichen.

Sollte der Unterschied zwischen den p53-defizienten Zellen und dem Wildtyp tat-

#### 4. Diskussion

sächlich auf einem Unterschied im Auftreten programmierten Zelltodes beruhen, dann müsste man davon ausgehen, dass die anderen Knockout-Mutanten ebenfalls von diesem betroffen sind.

Es ist aber auch möglich, dass die geringere Anzahl an DSBs gegen Ende des Messzeitraumes bei p53-defizienten NALM Zellen auf einen Zusammenhang von p53 mit dem NHEJ zurückzuführen ist. Und dass deswegen eine Behinderung des NHEJs über eine Wortmanningabe diesen Zusammenhang nicht zum Tragen kommen lässt. Das Protein p53 spielt eine wichtige Rolle in der DSB-Reparatur und hat direkten oder indirekten Einfluss auf mehrere DNA-Reparaturmechanismen [Sengupta, Harris, 2005, Keimling, Wiesmüller, 2009]. Wie p53 auf das NHEJ einwirkt, ist nicht geklärt. Es wurden sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte beobachtet [Sengupta, Harris, 2005]. Von dieser Perspektive aus gesehen, sprechen die Ergebnisse mit NALM Zellen für eine Inhibition des NHEJs, deren Effekt messbar ist, solange das NHEJ nicht ohnehin schon blockiert wird.

#### 4.7. B-NHEJ

In allen mit NALM Zellen durchgeführten Messungen der Reparaturkinetik, in denen wichtige Proteine des NHEJs entweder fehlten oder inhibiert wurden (DNA Ligase IV, DNA-PK), ist eine zwar langsamere, aber weiterhin effiziente Reparatur von DSBs zu beobachten. Das trifft auch dann zu, wenn zusätzlich noch ein wahrscheinlich wichtiges Protein der HR (RAD54) nicht zur Verfügung steht. Bei DNA-PK-Inhibition in Verbindung mit einer DNA Ligase IV Defizienz ist davon auszugehen, dass das NHEJ ausgeschaltet wurde. Ist zusätzlich die HR wegen einer RAD54-Defizienz gestört, dann resultiert daraus eine Reparaturkinetik, in der keine schnelle Komponente abgrenzbar ist. Eine alleinige DNA-PK-Inhibition RAD54-defizienter Zellen reicht aber aus, um so eine Reparaturkinetik hervorzurufen. Man kann die verbliebene Restaktivität dem B-NHEJ zuordnen. Es ist aber unklar, wie stark die HR zu der Restaktivität beiträgt

#### 4. Diskussion

[Wang et al., 2001b, Wu et al., 2008a, Wu et al., 2008b].

Es wird versucht, Inhibitoren, die sich gegen das NHEJ oder die HR richten, klinisch als Radiosensitizer einzusetzen. Dazu gehören auch DNA-PK-Inhibitoren [Bolderson et al., 2009]. Es zeigt sich aber, wie robust die DSB-Reparatur nach dem Ausschalten des NHEJs und dem Behindern der HR immer noch ist. Bei so einer hohen verbleibenden Restaktivität ist es gut möglich, dass es sich als vorteilhaft erweisen könnte, zusätzlich das B-NHEJ zu blockieren, um die Reparatur noch weiter zu verschlechtern. Zukünftige Experimente, bei denen Proteine, die zum B-NHEJ gerechnet werden, gezielt genetisch ausgeschaltet oder inhibiert werden, könnten dazu beitragen, diese Frage zu klären. Allerdings ist die Enzymologie des B-NHEJs noch weitgehend ungeklärt. Diese abzuklären und die Mechanismen, durch die reguliert wird, welcher Reparaturmechanismus zum Einsatz kommt, zu ergründen, wird in den kommenden Jahren Gegenstand der Forschung sein. Ebenso wann und warum auf fehlerträchtige Reparatursysteme zurückgegriffen wird, obgleich weniger fehlerträchtige Mechanismen in Form der HR zur Verfügung stehen. Außerdem wirft der Umstand, dass das B-NHEJ aufgrund seiner Fehlerträchtigkeit zu genomischer Instabilität und dadurch zur malignen Entartung führen kann, auch die Frage auf, welche genaue Rolle diesem in der Karzinogenese zukommt.

## 5. Zusammenfassung

DNA-Doppelstrangbrüche sind gefährliche endogen oder exogen verursachte Läsionen, die den Zelltod, Informationsverlust und Mutationen zur Folge haben können. In der vorliegenden Studie wurde die Kinetik der Reparatur dieser Läsionen in menschlichen Zellen unter Verwendung der asymmetrischen Feldinversionsgelelektrophorese gemessen und untersucht, wie sich diese ändert, wenn bestimmte direkt oder indirekt an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine gezielt genetisch ausgeschaltet oder chemisch inhibiert wurden. Das Ziel war es, den Beitrag ihrer Funktion und der von ihnen abhängigen Mechanismen an der Gesamtreparatur zu erforschen.

Nach Ausschalten von DNA Ligase IV oder Inhibition von DNA-PK, wichtiger Proteine des non-homologous end-joinings (NHEJ), wurde dessen hoher Anteil an der Gesamtreparatur ersichtlich. Eine Defizienz des DNA-Enden modifizierenden Proteins Artemis zeigte einen soliden Beitrag dieses Schrittes und der additive Effekt vor dem Hintergrund eines stillgelegten NHEJs legt eine Beteiligung von Artemis an weiteren Reparaturwegen nahe. Das Ausschalten von RAD54 zeigte einen Beitrag der homologen Rekombination (HR), der höher ausfällt, als durch Analogieschluss aus Daten von Zellen mit anderen Mutationen und von Zellen anderer Tiere angenommen wurde. Das Deaktivieren des Tumorsuppressors p53 brachte einen leichten Vorteil, der auf eine inhibierende Wirkung von p53 auf das NHEJ oder auf einen selteneren Zelltod zurückgehen könnte. Auch nach Stilllegung des NHEJs und einer Beeinträchtigung der HR zeigte sich eine weiterhin robuste Reparatur, was die Bedeutung verbliebener Mechanismen wie dem Backup-NHEJ demonstriert.

# Literaturverzeichnis

- [Adachi et al., 2006] – 1 – Adachi, N., So, S., Iizumi, S., Nomura, Y., Murai, K., Yamakawa, C., Miyagawa, K., Koyama, H. (2006): The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol.* 25, 19-24
- [Adachi et al., 2008] – 2 – Adachi, N., Nishijima, H., Shibahara, K. (2008): Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line. *Biosci Trends.* 2, 169-180
- [Akopiants et al., 2009] – 3 – Akopiants, K., Zhou, R.Z., Mohapatra, S., Valerie, K., Lees-Miller, S.P., Lee, K.J., Chen, D.J., Revy, P., de Villartay, J.P., Povirk, L.F. (2009): Requirement for XLF/Cernunnos in alignment-based gap filling by DNA polymerases  $\lambda$  and  $\mu$  for nonhomologous end joining in human whole-cell extracts. *Nucleic Acids Res.* 37, 4055-4062
- [Allen et al., 2003] – 4 – Allen, C., Halbrook, J., Nickoloff, J.A. (2003): Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res.* 1, 913-920
- [Audebert et al., 2004] – 5 – Audebert, M., Salles, B., Calsou, P. (2004): Involvement of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand-breaks rejoining. *J Biol Chem.* 279, 55117-55126
- [Bennardo et al., 2008] – 6 – Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., Stark, J.M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* 4, e1000110

- [Bernstein et al., 2005] – 7 – Bernstein, N.K., Williams, R.S., Rakovszky, M.L., Cui, D., Green, R., Karimi-Busheri, F., Mani, R.S., Galicia, S., Koch, C.A., Cass, C.E., Durocher, D., Weinfeld, M., Glover, J.N. (2005): The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Mol Cell*. 17, 657-670
- [Beucher et al., 2009] – 8 – Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2009): ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J*. 28, 3413-3427
- [Boehme et al., 2008] – 9 – Boehme, K.A., Kulikov, R., Blattner, C. (2008): p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 7785-7790
- [Bolderson et al., 2009] – 10 – Bolderson, E., Richard, D.J., Zhou, B.B., Khanna, K.K. (2009): Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res*. 15, 6314-6320
- [Bryans et al., 1999] – 11 – Bryans, M., Valenzano, M.C., Stamato, T.D. (1999): Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat Res*. 433, 53-58
- [Bryant et al., 2005] – 12 – Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T. (2005): Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 434, 913-917
- [Bugreev et al., 2006] – 13 – Bugreev, D.V., Mazina, O.M., Mazin, A.V. (2006): Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature*. 442, 590-593
- [Bugreev et al., 2007] – 14 – Bugreev, D.V., Hanaoka, F., Mazin, A.V. (2007): Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat Struct Mol Biol*. 14, 746-753

- [Capell et al., 2009] – 15 – Capell, B.C., Tloutan, B.E., Orlow, S.J. (2009): From the rarest to the most common: insights from progeroid syndromes into skin cancer and aging. *J Invest Dermatol.* 129, 2340-2350
- [Chappell et al., 2002] – 16 – Chappell, C., Hanakahi, L.A., Karimi-Busheri, F., Weinfield, M., West, S.C. (2002): Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J.* 21, 2827-2832
- [Chi et al., 2006] – 17 – Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., Sung, P. (2006): Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 in recombinase function. *DNA Repair (Amst).* 5, 381-391
- [Chipuk, Green, 2005] – 18 – Chipuk, J.E., Green, D.R. (2005): Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 268-75
- [Chistiakov et al., 2009] – 19 – Chistiakov, D.A., Voronova, N.V., Chistiakov, A.P. (2009): Ligase IV syndrome. *Eur J Med Genet.* 52, 373-378
- [Collis et al., 2005] – 20 – Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A., Parker, A.R. (2005): The life and death of DNA-PK. *Oncogene.* 24, 949-961
- [Constantinou et al., 2002] – 21 – Constantinou, A., Chen, X.B., McGowan, C.H., West, S.C. (2002): Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO J.* 21, 5577-5585
- [Darroudi et al., 2007] – 22 – Darroudi, F., Wiegant, W., Meijers, M., Friedl, A.A., von der Burg, M., Fomina, J., van Dongen, J.J., van Gent, D.C., Zdzienicka, M.Z. (2007): Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutat Res.* 615, 111-24

- [DeFazio et al., 2002] – 23 – DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., Chu, G. (2002): Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192-3200
- [DiBiase et al., 2000] – 24 – DiBiase, S.J., Zeng, Z.C., Chen, R., Hyslop, T., Curran W.J. Jr., Iliakis G. (2000): DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res.* 60, 1245-1253
- [D’Mello et al., 1998] – 25 – D’Mello, S.R., Aglieco, F., Roberts, M.R., Borodezt, K., Haycock, J.W. (1998): A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K<sup>+</sup> deprivation. *J Neurochem.* 70, 1809-1818
- [Ellenberger, Tomkinson, 2008] – 26 – Ellenberger, T., Tomkinson, A.E. (2008): Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem.* 77, 313-338
- [Essers et al., 1997] – 27 – Essers, J., Hendriks, R.W., Swagemakers, S.M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R. (1997): Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell.* 89, 195-204
- [Filippini et al., 1998] – 28 – Filippini, G., Griffin, S., Uhr, M., Eppenberger, H., Bonilla, J., Cavalli, F., Soldati, G. (1998): A novel flow cytometric method for the quantification of p53 gene expression. *Cytometry.* 31, 180-186
- [Finnie et al., 1995] – 29 – Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo, P.A., Jackson, S.P. (1995): DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 320-324
- [Grawunder et al., 1997] – 30 – Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., Lieber, M.R. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by



complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*. 388, 492-495

[Grawunder et al., 1998] – 31 – Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., Lieber, M.R. (1998): DNA Ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell*. 2, 477-484

[Griffiths et al., 1997] – 32 – Griffiths, S.D., Clarke, A.R., Healy, L.E., Ross, G., Ford, A.M., Hooper, M.L., Wyllie, A.H., Greaves, M. (1997): Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene*. 14, 523-31

[Gu et al., 2007a] – 33 – Gu, J., Lu, H., Tsai, A.G., Schwarz, K., Lieber, M.R. (2007): Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res*. 35, 5755-5762

[Gu et al., 2007b] – 34 – Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., Lieber, M.R. (2007): XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J*. 26, 1010-1023

[Gurley et al., 2009] – 35 – Gurley, K.E., Moser, R., Gu, Y., Hasty, P., Kemp, C.J. (2009): DNA-PK suppresses a p53-independent apoptotic response to DNA damage. *EMBO Rep*. 10, 87-93

[Hammel et al., 2010] – 36 – Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B.L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B.M., Rambo, R.P., Hura, G.L., Pelikan, M., So, S., Abolfath, R.M., Chen, D.J., Lees-Miller, S.P., Trainer, J.A. (2010): Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol. Chem*. 285, 1414-1423

[Hashimoto et al., 2003] – 37 – Hashimoto, M., Rao, S., Tokuno, O., Yamamoto, K., Takata, M., Takeda, S., Utsumi, H. (2003): DNA-PK: the major target for

wortmannin-mediated radiosensitization by the inhibition of DSB repair via NHEJ pathway. *Radiation Research* (Tokyo). 44, 151-159

[Helleday, 2010] – 38 – Helleday, T. (2010): Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*. 31, 955-960

[Hurwitz et al., 1979] – 39 – Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I., Kersey, J. (1979): Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer*. 23, 174-180

[Iliakis et al., 2004] – 40 – Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., Pantelias, G. (2004): Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*. 104, 14-20

[Ip et al., 2008] – 41 – Ip, S.C., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., West, S.C. (2008): Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*. 456, 357-361

[Iwabuchi et al., 2006] – 42 – Iwabuchi, K., Hashimoto, M., Matsui, T., Kurihara, T., Shimizu, H., Adachi, N., Ishiai, M., Yamamoto, K., Tauchi, H., Takata, M., Koyama, H., Date, T. (2006): 53BP1 contributes to survival of cells irradiated with X-ray during G1 without Ku70 or Artemis. *Genes Cells*. 8, 935-48

[Jiang et al., 2010] – 43 – Jiang, L., Sheikh, M.S., Huang, Y. (2010): Decision making by p53: life versus death. *Mol Cell Pharmacol*. 2, 69-77

[Jensen et al., 2010] – 44 – Jensen, R.B., Carreira, A., Kowalczykowski, S.C. (2010): Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*. 467, 678-683

- [Kanno et al., 2007] – 45 – Kanno, S., Kuzuoka, H., Sasao, S., Hong, Z., Lan, L., Nakajima, S., Yasui, A. (2007): A novel human AP endonuklease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J.* 26, 2094-2103
- [Keimling, Wiesmüller, 2009] – 46 – Keimling, M., Wiesmüller, L. (2009): DNA double-strand break repair activities in mammary epithelial cells–influence of endogenous p53 variants. *Carcinogenesis*. 30, 1260-1268
- [Killen et al., 2009] – 47 – Killen, M.W., Stults, D.M., Adachi, N., Hanakahi, L., Pierce, A.J. (2009): Loss of Bloom syndrome protein destabilizes human gene cluster architecture. *Hum Mol Genet.* 18, 3417-3428
- [Kim et al., 2005] – 48 – Kim, J.S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M., Yokomori, K. (2005): Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol.* 170, 341-347
- [Kinner et al., 2008] – 49 – Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. (2008): Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678-5694
- [Kroemer et al., 2009] – 50 – Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell Death 2009. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3-11
- [Kysela et al., 2005] – 51 – Kysela, B., Chovanec, M., Jeggo, P.A. (2005): Phosphorylation of linker histones by DNA-dependent protein kinase is required for DNA

ligase IV-dependent ligation in the presence of histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1877-1882

[Li et al., 2008] – 52 – Li, Y., Chirgadze, D.Y., Bolanos-Garcia, V.M., Sibanda, B.L., Davies, O.R., Ahnesorg, P., Jackson, S.P., Blundell, T.L. (2008): Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *EMBO J.* 27, 290-300

[Limbo et al., 2007] – 53 – Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C., Russell, P. (2007): Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell.* 28, 134-146

[Ma et al., 2002] – 54 – Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R. (2002): Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 108, 781-794

[Ma et al., 2005] – 55 – Ma, Y., Schwarz, K., Lieber, M.R. (2005): The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps and gaps. *DNA Repair (Amst).* 4, 845-851

[Mansour et al., 2010] – 56 – Mansour, W.Y., Rhein, T., Dahm-Daphi, J. (2010): The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* 38, 6065-6077

[Mao et al., 2008] – 57 – Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V. (2008): DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycles in human cells. *Cell Cycle.* 7, 2902-2906

[Mazin et al., 2010] – 58 – Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V., Rossi, M.J.

- (2010): Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. 9, 286-302
- [McIlwraith et al., 2005] – 59 – McIlwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., West, S.C. (2005): Human DNA polymerase  $\eta$  promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell*. 25, 783-792
- [Mills et al., 2004] – 60 – Mills, K.D., Ferguson, D.O., Essers, J., Eckersdorff, M., Kanaar, R., Alt, F.W. (2004): Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev*. 18, 1283-1292
- [Moshous et al., 2001] – 61 – Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., de Villartay, J.P. (2001): Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*. 105, 177-186
- [Nagata et al., 2003] – 62 – Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H. (2003): Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*. 10, 108-116
- [Neale, Keeney, 2006] – 63 – Neale, M.J., Keeney, S. (2006): Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature*. 442, 153-158
- [Nick McElhinny et al., 2005] – 64 – Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A., Ramsden, D.A. (2005): A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*. 19, 357-366
- [Olivier et al., 2010] – 65 – Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P. (2010): TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2, a001008

- [Perrault et al., 2004] – 66 – Perrault, R., Wang, H., Wang, M., Rosidi, B., Iliakis, G. (2004): Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J Cell Biochem.* 92, 781-794
- [Povirk et al., 2007] – 67 – Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R., Cowman, M.J., Yannone, S.M. (2007): Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J Biol Chem.* 282, 3547-3558
- [Rass et al., 2009] – 68 – Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., Lopez, B.S. (2009): Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 819-824
- [Raynard et al., 2006] – 69 – Raynard, S., Bussen, W., Sung, P. (2006): A double Holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase III $\alpha$ , and BLAP75. *J Biol Chem.* 281, 13861-13864
- [Riballo et al., 2004] – 70 – Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C., Recio, M.J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A.R., Jackson, S.P., Gennery, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell.* 16, 715-724
- [Rosidi et al., 2008] – 71 – Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., Iliakis, G. (2008): Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* 36, 1610-1623
- [Roberts et al., 2010] – 72 – Roberts, S.A., Strande, N., Burkhalter, M.D., Strom, C., Havener, J.M., Hasty, P., Ramsden, D.A. (2010): Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature.* 464, 1214-1217
- [Rothkamm et al., 2003] – 73 – Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., Löbrich, M. (2003): Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 23, 5706-5715

- [San Filippo et al., 2008] – 74 – San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 77, 229-257
- [Sengupta, Harris, 2005] – 75 – Sengupta, S., Harris, C.C. (2005): p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 44-55
- [Sibanda et al., 2001] – 76 – Sibanda, B.L., Critchlow, S.E., Begun, J., Pei, X.Y., Jackson, S.P., Blundell, T.L., Pellegrini, L. (2001): Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol.* 8, 1015-1019
- [Sibanda et al., 2010] – 77 – Sibanda, B.L., Chirgadze, D.Y., Blundell, T.L. (2010): Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature.* 463, 118-121
- [Stamato, Denko, 1990] – 78 – Stamato, T.D., Denko, N. (1990): Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 121, 196-205
- [Sung, Robberson, 1995] – 79 – Sung, P., Robberson, D.L. (1995): DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell.* 82, 453-461
- [Takeda et al., 2007] – 80 – Takeda, S., Nakamura, K., Taniguchi, Y., Paull, T.T. (2007): Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell.* 28, 351-352
- [Uematsu et al., 2007] – 81 – Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.O., van Gent, D.C., Chen, B.P.C., Chen, D.J. (2007): Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 177, 219-229
- [Valerie, Povirk, 2003] – 82 – Valerie, K., Povirk, L.F. (2003): Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene.* 22, 5792-5812

- [Vousden, Prives, 2009] – 83 – Vousden, K.H., Prives, C. (2009): Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 137, 413-431
- [Wang et al., 2001a] – 84 – Wang, H., Zeng, Z.C., Bui, T.A., DiBiase, S.J., Qin, W., Xia, F., Powell, S.N., Iliakis, G. (2010): Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res*. 61, 270-277
- [Wang et al., 2001b] – 85 – Wang, H., Zeng, Z.C., Bui, T.A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Iliakis, G. (2001): Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*. 20, 2212-2224
- [Wang et al., 2005] – 86 – Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., Iliakis, G. (2005): DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*. 65, 4020-4030
- [Wang et al., 2006] – 87 – Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., Iliakis, G. (2006): PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*. 34, 6170-6182
- [Walker et al., 2001] – 88 – Walker, J.R., Corpina, R.A., Goldberg, J. (2001): Structure of the KU heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 412, 607-614
- [Ward, 1988] – 89 – Ward, J.F. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 35, 95-125
- [Windhofer et al., 2007] – 90 – Windhofer, F., Wu, W., Wang, M., Singh, S.K., Saha, J., Rosidi, B., Iliakis, G. (2007): Marked dependence on growth state of backup pathways of NHEJ. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 68, 1462-1470



- [Wlodarska et al., 1997] – 91 – Wlodarska, I., Aventín, A., Inglés-Esteve, J., Falzetti, D., Criel, A., Cassiman, J.J., Mecucci, C., Van den Berghe, H., Marynen, P. (1997): A new subtype of pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(5;12)(q31q33;p12), molecularly and cytogenetically distinct from t(5;12) in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 89, 1716-1722
- [Wold, 1997] – 92 – Wold, M.S. (1997): Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*. 66, 61-92
- [Wu, Hickson, 2003] – 93 – Wu, L., Hickson, I.D. (2003): The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. 426, 870-874
- [Wu et al., 2008a] – 94 – Wu, W., Wang, M., Wu, W., Singh, S.K., Mussfeldt, T., Iliakis, G. (2008): Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)*. 7, 329-338
- [Wu et al., 2008b] – 95 – Wu, W., Wang, M., Mussfeldt, T., Iliakis, G. (2008): Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat Res*. 170, 512-520
- [Wyllie, 2010] – 96 – Wyllie, A.H. (2010): "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*. 42, 4-9
- [Yan et al., 2007] – 97 – Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., Alt, F.W. (2007): IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*. 449, 478-482
- [Yannone et al., 2008] – 98 – Yannone, S.M., Khan, I.S., Zhou, R.Z., Zhou, T., Valerie, K., Povirk, L.F. (2008): Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of ter-

## *Literaturverzeichnis*

minally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res.* 36, 3354-3365

[Yoo, Dynan, 1999] – 99 – Yoo, S., Dynan, W.S. (1999): Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.* 27, 4679-4686

[Yu et al., 2001] – 100 – Yu, X., Jacobs, S.A., West, S.C., Ogawa, T., Egelman, E.H. (2001): Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 8419-8424

# A. Verwendete Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
Art.Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
B-NHEJ	backup non-homologous end-joining
BLM	Bloom syndrome protein
BRCA2	breast cancer type 2 susceptibility protein
c	Kontrolle
C	Caspase Inhibitor III
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein
D <sub>eq</sub>	equivalent Gy dose
D-loop	displacement loop
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	DNA double stand break
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales bovines Serum
FDR	fraction of DNA released
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

## *A. Verwendete Abkürzungen*

HR	homologous recombination
M/ml	Millionen pro Milliliter
MEF	Mausembryofibroblast
MRE11	meiotic recombination 11
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NHEJ	non-homologous end-joining
PALF	PNK and APTX-like FHA protein
PBS	phosphate buffered saline
PNK	polynucleotide kinase
RPA	replication protein A
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS-SCID	radiosensitive severe combined immunodeficiency
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
W	Wortmannin
XLF	XRCC4-like factor
XRCC1	X-ray-complementing Chinese hamster gene 1
XRCC4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 4

## B. Danksagung

Ich möchte meine höchste Wertschätzung gegenüber meinem Mentor und Institutsdirektor Prof. Dr. George Iliakis zum Ausdruck bringen, welcher die Haltung und das Temperament für großartige Wissenschaft hat und der mit seinem Enthusiasmus und seiner Expertise immer eine Quelle der Inspiration war.

Ich freue mich, den engagierten Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Strahlenbiologie einen großen herzlichen Dank aussprechen zu dürfen. Von ihnen habe ich die Methoden gelernt und sie alle haben zu einer erhebenden Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Mein unermesslich liebevoller Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die mich immerwährend exzellent unterstützt und an meine Träume geglaubt haben.

Abschließend geht ein besonderer Dank an Herrn Noritaka Adachi, der die NALM Knockout-Mutanten auf brillante Weise erstellt und zur Verfügung gestellt hat.

## C. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.